

# **Ein modulares System zur sequenzselektiven Peptiderkennung**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Mark Wehner**  
aus Düsseldorf

Marburg/Lahn 2001

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation eingereicht am 21.11.2001 angenommen.

Erstgutachter : Prof. Dr. Schrader

Zweitgutachter : Prof. Dr. Carell

Tag der mündlichen Prüfung am 19.12.2001

gewidmet  
meinen Eltern  
und  
Lilli Kreutz

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 1999 bis März 2000 am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie II an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und von April 2000 bis Dezember 2001 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn unter der Leitung von Prof. Dr. T. H. Schrader.

Herrn Prof. Dr. T. H. Schrader danke ich für die interessante Themenstellung, die ausgezeichnete Betreuung und seine freundliche Unterstützung.

All meinen Kollegen im „AK Schrat“, besonders Herrn Dipl. Chem. O. Molt, danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die anregenden Diskussionen.

Meinem Laborkollegen Herrn Dipl. Chem. Jochen Bitta danke ich für die fröhliche und produktive Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. G. Siedlaczek möchte ich für die fachliche und freundschaftliche Unterstützung zu jeder Zeit und an jedem Ort danken.

Meiner Verlobten Frau Dipl. Chem. L. Kreutz danke ich für die aufmunternden Worte, die Geduld und das Verständnis, das sie mir stets entgegen gebracht hat.

Herrn Dr. U. Matthiesen danke ich für das Anfertigen von zahlreichen Massenspektren.

## Verwendete Abkürzungen

Ac-	<i>N</i> -Acyl-
Boc <sub>2</sub> O	Di-tert.-butylcarbonat
DCC	<i>N</i> - <i>N</i> '-Dicyclohexylcarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
Tos	<i>p</i> -Toluolsulfonat
NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
-OMe	-Methylester
Pd/C	Palladium auf Kohle
PyCloP	Chlorotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
TFA	Trifluoressigsäure
TFA <sub>2</sub> O	Trifluoressigsäureanhydrid

Zur Vereinfachung werden in der Literatur für die Bezeichnung eines Komplexes die entsprechenden Zahlen der beiden untersuchten Verbindungen, mit dem Zeichen @ verbunden. In dieser Arbeit wird deshalb genauso verfahren.

Gemäß der allgemeinen Darstellungsweise wird die „Dreibuchstabenabkürzung“ für die Bezeichnung von Aminosäuren benutzt. Ebenfalls werden, wie bei der üblichen Schreibweise von Peptiden, diese vom *N*- zum *C*-Terminus genannt.

## Molecular Modelling

Wenn nicht anders ausgeführt, so wurde mit dem Programm MacroModel 7.0 gearbeitet, alle Berechnungen wurden in Chloroform durchgeführt und mit dem angegebenen Kraftfeld minimiert; MonteCarlo-Simulationen (MC) wurden mit 1000 steps und dem jeweiligen Kraftfeld berechnet.

MM	MacroModel
MC	MonteCarlo-Simulation, 1000 steps

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretischer Teil .....</b>	<b>14</b>
2.1	Problemstellung .....	14
2.2	Erhöhung der freien Bindungsenthalpie .....	17
2.2.1	Synthese der Dimeren .....	20
2.3	Bestimmung der Komplexstabilitätskonstanten mittels H-NMR-Spektroskopie ..	25
2.3.1	Komplexstöchiometrie .....	27
2.4	Bindungseigenschaften der Dimere .....	28
2.4.1	Vorüberlegungen .....	28
2.4.2	Verwendetes Lösungsmittelgemisch .....	28
2.4.3	Bindungseigenschaften der nicht-aromatischen Dimere .....	29
2.4.4	Bindungseigenschaften der aromatischen und hetereoaromatischen Dimere ....	34
2.5	Erkennung des spezifischen Rests einer Aminosäure im Peptidstrang .....	38
2.5.1	Vorüberlegungen .....	38
2.5.2	Auswahl der zu erkennenden Aminosäuren für die drei nichtkovalenten Wechselwirkungen .....	43
2.5.3	Darstellung der Wirtverbindungen .....	47
2.5.4	Untersuchung der Wirtverbindungen über NOE-Experimente .....	55
2.6	Untersuchung des Komplexierungsverhaltens der neuen Wirte .....	58
2.6.1	Voruntersuchungen .....	58
2.6.2	Untersuchung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke im Komplex .....	60
2.6.3	Untersuchung einer zusätzlichen $\pi$ -Stapelung im Komplex .....	64
2.6.4	Untersuchung einer zusätzlichen ionischen Bindung im Komplex .....	68
2.7	Verifizierung der berechneten Komplexgeometrien .....	73
<b>3</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>76</b>
<b>4</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>124</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>137</b>

# 1. Einleitung

Proteine sind Polymere aus Aminosäuren und nehmen im Organismus die vielfältigsten Aufgaben wahr. Sie bilden stabilisierende Strukturen, wie Collagen und Keratin, wirken als Rezeptoren, Signal-, oder Transportmoleküle und katalysieren als Enzyme die im Körper ablaufenden chemischen Reaktionen. Obwohl sie so unterschiedliche Aufgaben erfüllen, bestehen sie hauptsächlich aus 20 verschiedenen Aminosäure-Bausteinen. Die unterschiedliche chemische Beschaffenheit der einzelnen Aminosäureseitenketten ist für die Eigenschaft der aus ihnen bestehenden Polypeptidketten verantwortlich. Nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten führen zur Ausbildung bestimmter räumlicher Strukturen, die entscheidend für die Funktion eines Proteins sind.

Proteinfaltungskrankheiten (engl. protein folding diseases)<sup>[1]</sup> wie die Alzheimer'sche Krankheit, Kuru oder die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)<sup>[2-7]</sup> sind durch das Ausfallen von sogenannten Proteinplaques charakterisiert. Diese bilden im betroffenen Gewebe schwammartige Ablagerungen, die der Krankheit ihren Namen gab (Abb. 1).

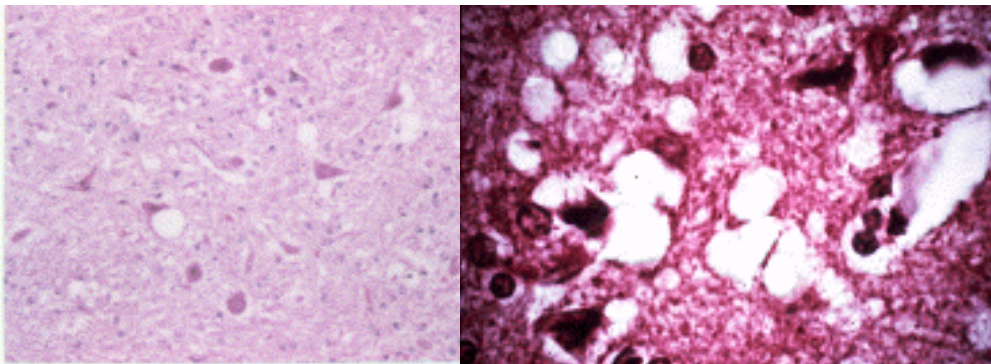


Abb. 1: Hirngewebe, das von einer Proteinfaltungskrankheit befallen ist: links: bei einer Kuh (BSE), rechts: Kuru, man erkennt in dem gesunden Gewebe (rot) die schwammartigen Ablagerungen (weiß)<sup>[8]</sup>.

Genaueste Untersuchungen des Gewebes von BSE-erkrankten Tieren zeigten, daß der daraus isolierte Erreger keine DNA besitzt sondern lediglich aus Peptiden und Kohlenhydraten besteht.

Prusiner zog aus diesen Ergebnissen die heute in weiten Kreisen anerkannte Hypothese, daß es sich bei den vorliegenden Erregern nicht um einen Virus handeln kann, sondern um ein proteinartiges infektiöses Agens (engl. proteinaceous infectious agent)<sup>[9]</sup>, welches aufgrund der leichten Aussprechbarkeit Prion genannt wurde. Damit war ein Dogma der

Molekularbiologie gefallen, welches fordert, daß belebte Materie immer Nucleinsäuren als Informationsträger besitzt.

Die heute am meisten vertretene “Nur-Eiweiß-Hypothese”<sup>[10]</sup> besagt, daß das Prionen enthaltene Protein (Prionprotein, PrP) aus dem Wirtorganismus stammt. Der Schlüsselschritt der Erkrankung ist die Umfaltung eines löslichen, gutartigen, zellulären Prionoproteins (PrP<sup>C</sup>) in die infektiöse, als “Scrapie-Form” bezeichnete Variante PrP<sup>Sc</sup>.<sup>[11]</sup> Durch CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß PrP<sup>C</sup> hauptsächlich  $\alpha$ -Helices besitzt, während, PrP<sup>Sc</sup> in großen Teilen in der  $\beta$ -Faltblatt-Konformation vorliegt;<sup>[12]</sup> in ihrer Aminosäuresequenz hingegen sind beide Varianten identisch.

Die infektiöse Vermehrung findet nach dem Heterodimer-Modell (Abb. 2)<sup>[13-15]</sup> so statt, daß das PrP<sup>Sc</sup> eine Konformationsänderung im gesunden PrP<sup>C</sup> verursacht und es ebenfalls in die PrP<sup>Sc</sup>-Form umwandelt. An das so gebildete Dimer lagern sich weitere PrP<sup>C</sup> an, die ebenfalls umgefaltet werden. Die Oligomere bilden unlösliche Aggregate, die ausfallen und dadurch die befallenen Zellen zerstören.

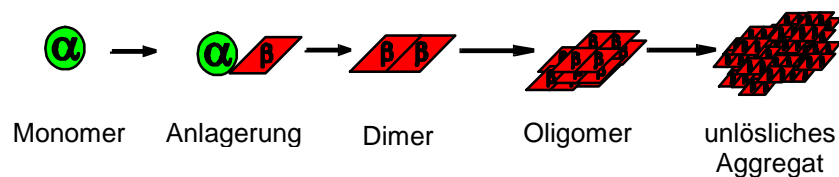


Abb. 2: Heterodimer-Modell der Vermehrung von Prionen. PrP<sup>C</sup>, welches hauptsächlich in  $\alpha$ -Helices besitzt ( $\alpha$ ) wird durch die Anlagerung eines,  $\beta$ -Faltblattreichen PrP<sup>Sc</sup> ( $\beta$ ) ebenfalls in die infektiöse Form umgewandelt. Dieses Dimer faltet weitere Proteine um, wodurch Oligomere entstehen, die bei weiterer Anlagerung zu unlöslichen Plaques aggregieren.

Die beiden Sekundärstrukturen, die im PrP hauptsächlich vorkommen, unterscheiden sich vor allem in der Ausrichtung der Amidbindungen in den Proteinen (Abb. 3). So werden in der  $\alpha$ -Helix die Carbonylgruppen alle in eine Raumrichtung ausgerichtet, so daß sie nach einer Helixwindung mit den ihnen entgegenzeigenden N-H-Protonen eine Wasserstoffbrücke eingehen können. In dieser Struktur sind alle Donoren und Akzeptoren eines Polypeptids abgesättigt.

Im  $\beta$ -Faltblatt hingegen wird durch Anlagerung eines benachbarten Peptidstrangs, lediglich die Hälfte der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen eingegangen. An der freien Seite kann sich ein weiteres Polypeptid anlagern.



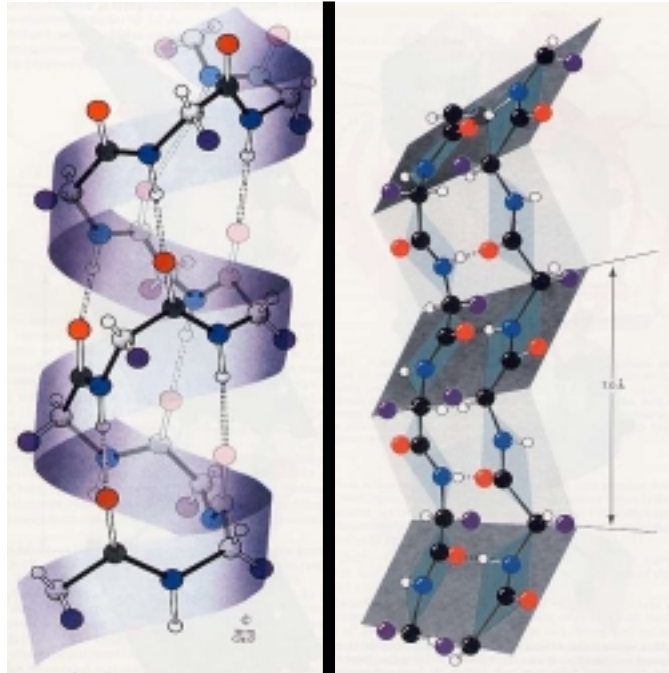


Abb. 3: die beiden wichtigsten Sekundärstrukturen des PrP, *links*: die  $\alpha$ -Helix, durch die Ausrichtung der C=O-Gruppen nach oben und der N-H-Bindung nach unten werden alle möglichen Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren abgesättigt, *rechts*: im  $\beta$ -F altblatt wird durch die Anlagerung eines zweiten Peptidstrangs nur die Hälfte der möglichen H-Brücken eingegangen, so daß sich ein weiterer Strang anlagern kann.<sup>[ 16]</sup>

PrP<sup>C</sup> besitzt ein kleines Segment welches sich in der  $\beta$ -F altblatt-Konformation befindet. Es wird nun angenommen, daß PrP<sup>S</sup> mit seiner ausgedehnten  $\beta$ -F altblatt-Region an eben dieses Segment andockt und dadurch die Umfaltung des PrP<sup>C</sup> hervorruft. Nachdem dieser Prozeß abgeschlossen ist, ragt die  $\beta$ -F altblatt-Region des neu entstandenen PrP<sup>S</sup> nach außen, so daß ein weiteres PrP<sup>C</sup> gewandelt werden kann. Ähnlich einem Impfkristall kann so ein PrP<sup>S</sup> hunderte von PrP<sup>C</sup> zur Aggregation bringen.

Ein Ansatz zur Rückfaltung des PrP<sup>S</sup> zurück in die lösliche Form wurde von Soto et al. vorgestellt.<sup>[ 17-19]</sup> Er synthetisierte ein Oligopeptid, welches 13 Aminosäuren enthielt. Dieses war dem  $\beta$ -F altblattsegment von PrP<sup>C</sup> weitgehend homolog. Soto tauschte jedoch mehrere Aminosäuren durch das gewinkelte Prolin aus. Dadurch konnte das gesamte Polypeptid nicht in die  $\beta$ -F altblatt-Konformation gedrängt werden, sondern brachten *in vivo* PrP<sup>S</sup> teilweise zurück in seine lösliche Form.<sup>[ 20]</sup>

Künstliche Moleküle, die in der Lage wären, P $\beta$ P zurückzufalten oder seine “klebrigen Stellen” zu verkappen, indem sie sich an die  $\beta$ -Faltblatt-Region anlagern, sind von großem pharmazeutischen Interesse, aber kaum bekannt.

Neben der immer noch ungenügend verstandenen  $\beta$ -Faltblattstruktur ist auch die aus dem Selbstorganisationsprozeß bei der Proteinfaltung resultierende Tertiärstruktur eines Proteins Gegenstand intensiver Forschung. In dieser Struktur sind die einzelnen Seitengruppen der Aminosäure in einem Polypeptid häufig so vororientiert, daß ein Hohlraum für ein bestimmtes Substratmolekül oder eine ganze Molekülklasse ausgebildet wird, welche so selektiv gebunden werden kann.<sup>[ 21]</sup>

Die Funktionsweise von Enzymen geht einen Schritt weiter; sie katalysieren chemische Reaktionen, indem das Substrat zwar zunächst in ihrem aktiven Zentrum gebunden wird, darauf hin aber chemisch umgewandelt wird. Die Bindung im aktiven Zentrum erfolgt in der Regel über mehrere verschiedene nicht-kovalente Wechselwirkungen, wobei das Zusammenwirken der einzelnen Kräfte eine relativ starke, reversible Anlagerung ermöglicht. Die Klärung der Funktionsweise von Enzymen stellt immer noch einen wichtigen Teil der heutigen biochemischen Forschung dar. Ein Teilgebiet in der Supramolekularen Chemie beschäftigt sich mit der synthetischen Nachahmung solcher Enzymbindungsaschen durch kleine Modellverbindungen.<sup>[ 22]</sup> Allgemein versteht man unter Supramolekularer Chemie die Chemie “über das Molekül hinaus”.<sup>[ 23-24]</sup> Wie in Abb. 4 angedeutet, wird durch eine klassisch synthetisierte molekulare Einheit ein Rezeptormolekül hergestellt, das nun mit einem oder mehreren passenden Substraten ein Supramolekül bildet.<sup>[ 25-26]</sup> Hierdurch wird im Labor unter anderem versucht, die Wirkungsweise von Enzymen zu simulieren und dadurch zum Beispiel Aufschlüsse über die Mechanismen ihrer Wechselwirkungen mit den entsprechenden Substraten zu erhalten.

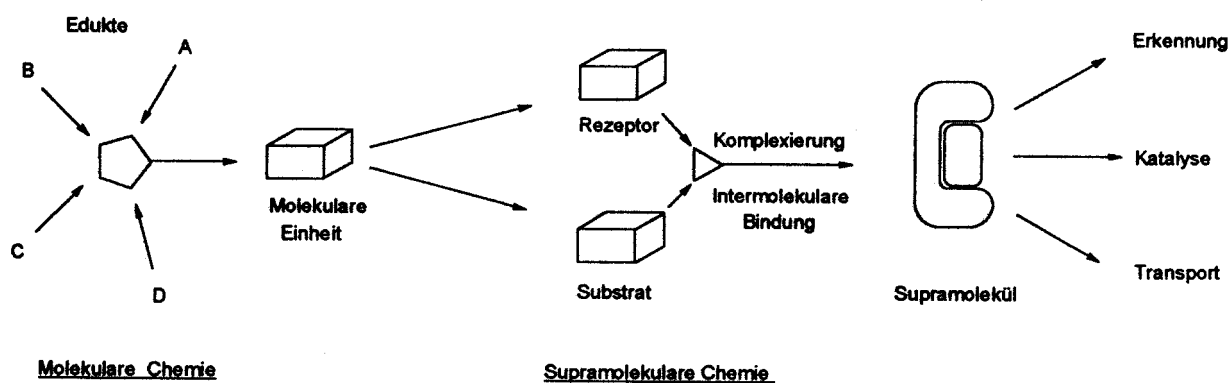


Abb. 4: Übergang von molekularer Chemie ( links) zu Supramolekularer Chemie ( rechts)<sup>[ 27]</sup>

Dabei ist bis heute wenig darüber bekannt, welchen Beitrag eine bestimmte Wechselwirkungen zur Gesamtbindungsstärke eines Komplexes liefert, noch inwieweit sich die einzelnen Effekte gegenseitig beeinflussen. Es gilt jedoch als sicher, daß sich die einzelnen Bindungsstellen, durch die gute Vororientierung einer Bindungstasche synergistisch verhalten. So binden Pharmaka in wäßriger Lösung im Bereich von  $10^6$  bis  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , obwohl die meisten in der Regel maximal fünf Wasserstoffbrückendonoren und – akzeptoren, höchstens drei aromatische Systeme enthalten und dazu ungeladen sind.<sup>[ 25]</sup>

Die bei einem Enzym-Substrat Komplex auftretenden nicht-kovalenten Wechselwirkungen sollen hier kurz angesprochen werden.

Sind Wirt und Gast entgegengesetzt geladen, dann ziehen sie sich gegenseitig an. Solche *ionischen Wechselwirkungen* sind im Vergleich zu den meisten anderen Interaktionen über längere Distanzen effektiv.<sup>[ 28-29]</sup>

Im Gegensatz dazu ist die *Wasserstoffbrücke* eine gerichtete Kraft, die zu den Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zählt.<sup>[ 30-31]</sup> Diese bildet sich zwischen einem Proton der Donorgruppe ( D-H ), in der D ein elektronegativeres Atom als Wasserstoff ist, und einem weiteren Akzeptoratom ( A ) mit einem freien Elektronenpaar. D zieht vom Wasserstoffatom Elektronendichte ab, so daß dies eine positive Partialladung trägt und somit stark vom freien Elektronenpaar des Atoms A angezogen wird. Dabei ist die Bindungsstärke maximal, wenn Donor, Wasserstoffatom und Akzeptor auf einer Geraden liegen. Dies ist am Beispiel von zwei Wassermolekülen in Abb. 5 gezeigt.<sup>[ 16]</sup>

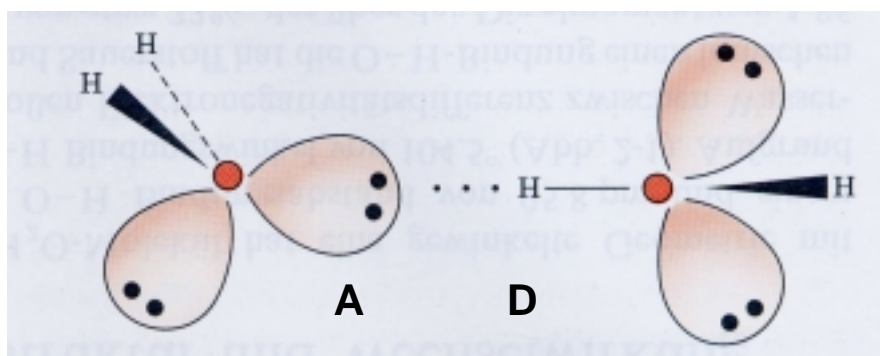


Abb. 5: Wasserstoffbrücke ( gepunktete Linie) zwischen zwei Wassermolekülen, wenn sich das freie Elektronenpaar des Akzeptors auf einer geraden Linie mit der OH-Gruppe des Donors befindet, ist diese maximal.<sup>[ 16]</sup>

Nähert sich ein Molekül mit guten  $\pi$ -Elektronendonoreigenschaften einem anderen Molekül mit guten  $\pi$ -Elektronenakzeptoreigenschaften, so kann der Donor einen Teil seiner Ladung auf den Akzeptor übertragen. Bei aromatischen Systemen spricht man dabei von  $\pi$ - $\pi$ -*Stapelung*<sup>[ 32-34]</sup>wobei die Wechselwirkungen dann stark sind, wenn die Komplexpartner stark unterschiedliche elektronische Eigenschaften haben.<sup>[ 35-38]</sup>Einen starken  $\pi$ -Donor erhält man durch das Einführen elektronenschiebender Substituenten wie Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefelenthaltenden Gruppen. Umgekehrt zeichnen sich  $\pi$ -Akzeptoren durch elektronenziehende Gruppen aus, wie Nitrile, Halogene und Nitrogruppen. Zwei solche Aromaten sind in Abb. 6 gezeigt, wobei die Seitengruppe des Tyrosin als Elektronendonor fungiert.

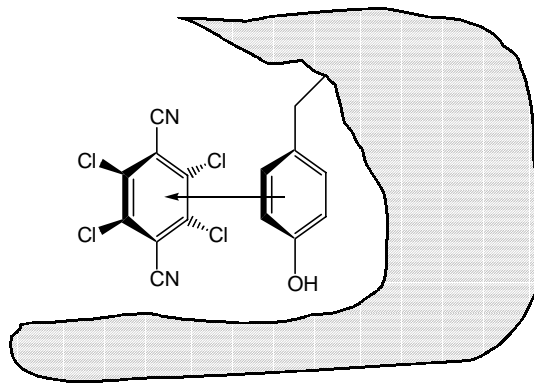


Abb. 6: Beispiel einer  $\pi$ - $\pi$ -Stapelung im Protein-Ligand-Komplex. Die schraffierte Fläche symbolisiert die Rezeptor-oberfläche.<sup>[ 27]</sup>

Zusätzlich gibt es eine starke Wechselwirkung, die als Mischung zwischen den bisher besprochenen angesehen werden kann. Tritt nämlich ein Kation in anziehenden Kontakt mit der Elektronenwolke eines Aromaten, so spricht man von einer *Kation- $\pi$ -Wechselwirkung*.<sup>[ 39-42]</sup>

Eine weitere wichtige Wechselwirkung ist der *hydrophobe Effekt*.<sup>[ 43-45]</sup>Dabei wird der Kontakt von unpolaren Substanzen mit polaren Lösungsmitteln, meistens Wasser, minimiert.<sup>[ 46]</sup>Zur Solvation eines unpolaren Moleküls oder einer unpolaren Region, die sich in wässrigem Milieu befindet, gehen die Lösungsmittelmoleküle eine Nahordnung ein ( Abb. 7) . Nähern sich zwei dieser lipophilen Gruppen auf *van der Waals*-Abstand, so verringert dies ihre Kontaktfläche zum Solvens und die freigesetzten Wassermoleküle können einen ungeordneteren Zustand annehmen. Die Komplexierung beruht also auf einer Zunahme der Entropie des Lösungsmittels. Ein biologisches Beispiel für den hydrophoben Effekt ist die Ausbildung der Doppelmembran von Zellen.<sup>[ 47]</sup>

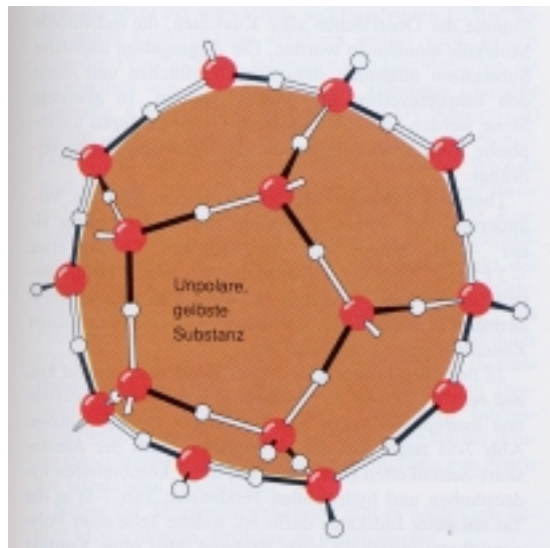


Abb. 7: Modell des hydrophoben Effekts; eine unpolare Substanz ( braun) wird durch einen Käfig von Wassermolekülen umgeben, die dadurch eine Nahordnung besitzen.<sup>[ 27]</sup> Bei der Annäherung eines zweiten unpolaren Moleküls wird ein Teil dieser hoch geordneten Solvathülle freigesetzt.

Benachbarte apolare Moleküle können außerdem vorübergehend gegenseitig eine Verschiebung der Elektronendichteverteilung induzieren, wodurch ein temporärer Dipol gebildet wird; nähert sich ein Gastmolekül mit einem solchen Dipol einem Wirtmolekül, so wird in diesem ebenfalls ein Dipol mit entgegengesetzter Orientierung hervorgerufen. Dies wird als *van der Waals-Kraft* bezeichnet.<sup>[ 48]</sup> Diese schwachen Kräfte sind hauptsächlich in polarem Milieu von Bedeutung und auch nur dann wenn es zu engen Kontakten kommt.

Bei der Bindung eines Gastmoleküls durch einen Wirt entsteht ein geordneter Komplex, der die Translations- und Rotationsfreiheitsgrade der Einzelverbindungen einfriert. Die Stärke der Komplexbildung wird um diesen Entropiebetrag verringert. Deshalb sind in Enzymen die Bindungstaschen für das zu bindende Substrat meist rigide vororientiert, wodurch ein geringerer Entropieverlust für den Wirt im Komplex resultiert.

Dieselben Überlegungen gelten auch für den gebundenen Gast, welcher seine Translations- und Rotationsfreiheitsgrade im Komplex verliert. Aus diesem Grunde sind Pharmazeutika in der Regel starre Verbindungen, die häufig aus Aromaten oder anderen rigiden Bausteinen bestehen. Dabei werden die meisten Medikamente durch den Synergieeffekt aller nicht-kovalenten Wechselwirkungen im aktiven Zentrum eines natürlichen Rezeptors hoch selektiv und mit hohen Assoziationskonstanten gebunden.<sup>[ 28]</sup>

Aufgrund der zentralen Bedeutung von Peptiden und ihren Rezeptoren in der Natur wurden, zum besseren Verständnis der Faltungs- und Bindungsmodi, zahlreiche Modellverbindungen für ihre Sekundärstrukturen publiziert. Diese sind im Vergleich zu natürlichen Proteinen absichtlich kleiner gewählt, so daß sie mit den Methoden der organischen Chemie, wie Röntgenstrukturanalyse, IR- und NMR-Spektroskopie gut untersucht werden können.<sup>[23]</sup> Eine immer noch wenig verstandene Sekundärstruktur ist die  $\beta$ -Faltblattstruktur.

Feigel<sup>[49-51]</sup> stellte 1986 eine Verbindung her, in der über zwei Biphenyle zwei Tripeptide in großer räumliche Nähe gebracht wurden (Abb. 8). Durch die Wahl der Spacer konnte ein paralleles und antiparalleles Faltblatt in den Peptiden simuliert werden. Mittels NMR-Untersuchungen in DMSO und Moleküldynamikrechnungen konnten die determinierten Konformere nachgewiesen werden.

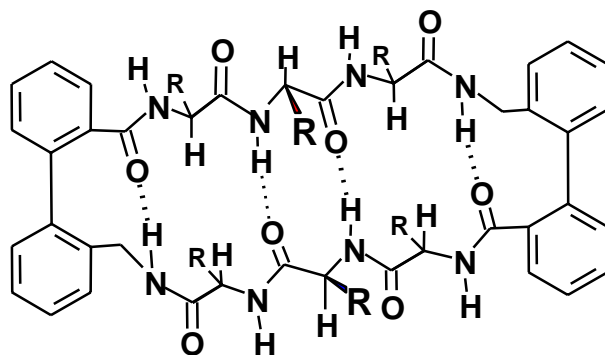


Abb. 8: Modellverbindung eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts nach Feigel et al.

Kemp konnte etwas später über ein Epindolidion-Templat, an welches zwei Pentapeptide gebunden wurden, eine offenkettige Verbindung herstellen, die ebenfalls eine  $\beta$ -Faltblattkonformation einging. Dabei wurden die Peptidstränge durch den Einbau eines Prolins in einer  $\beta$ -Turn analogen Form vororientiert.<sup>[52-54]</sup>

In Wasser gelang es Kelly, durch die Wahl eines Dibenzofuranspacers, die Konformation eines kurzen Peptidstranges in einem offenkettigen System zu fixieren. Dabei postulierte er, daß mit den ersten, kovalent am Spacer gebundenen unpolaren Aminosäureresten ein hydrophober Cluster gebildet wird, der als Keim für die  $\beta$ -Faltblattentstehung wirkt; so ähnlich stellt man sich diesen Prozeß auch in der Natur vor (Abb. 9).<sup>[55-59]</sup>

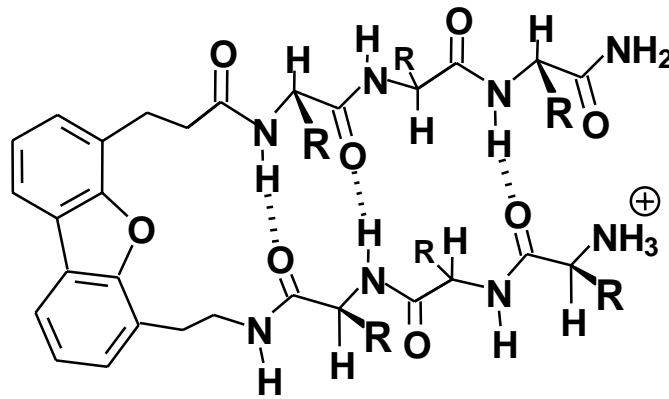


Abb. 9: Offenkettiger Makrocyclus mit Dibenzofuranspacer von Kelly.

Eine weitere Molekülklasse, welche intramolekulare Wasserstoffbrücken ausnutzt, um die  $\beta$ -Faltblatt-Konformation in einem Peptidstrang zu stabilisieren, wurde von Nowick<sup>[60-63]</sup> et al. etabliert. Dabei werden zur Bindung an ein Peptidrückgrat nicht-peptidische Seitenarme verwendet (Abb. 10). Die Reihenfolge und der Abstand der einzelnen Donoren und Akzeptoren in diesen Substituenten entspricht exakt dem eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt. Es handelt sich auch hier jedoch um intramolekulare Wechselwirkungen.

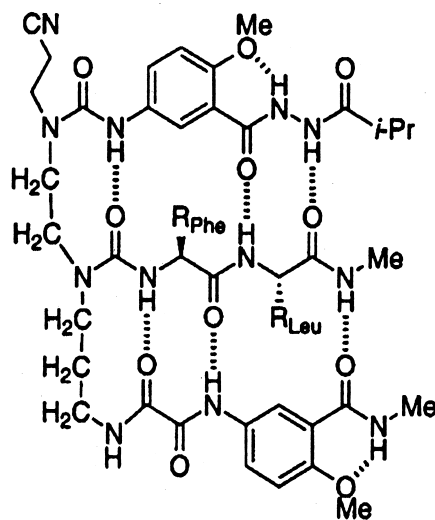


Abb. 10: intramolekulare  $\beta$ -Faltblattstabilisierung mittels nicht-peptidischer Seitenarme nach Nowick, ein dreisträngiges  $\beta$ -Faltblattmodell<sup>[64]</sup>

Es wurden auch Verbindungen vorgestellt, die eine Selektivität für die spezifischen Seitenketten von Aminosäuren besitzen. Still et al. konnten 1990 einen Rezeptor entwickeln, welcher durch intermolekulare Wasserstoffbrücken unspezifisch unterschiedlich geschütztes

Alanin und Dialanin in Chloroform mit Bindungskonstanten von 10 bis  $100 \text{ M}^{-1}$  bindet ( Abb. 11) <sup>[ 65]</sup> Dabei wurde ein Diiodtyrosin eingebaut, wodurch ein chiraler Wirt entstand, der mäß ige chirale Selektivitäten für bestimmte Enantiomere der angebotenen Aminosäuren und Dipeptide zeigte. Eine Vorzugskonformation des komplexierten Dipeptids konnte allerdings nicht bestimmt werden.

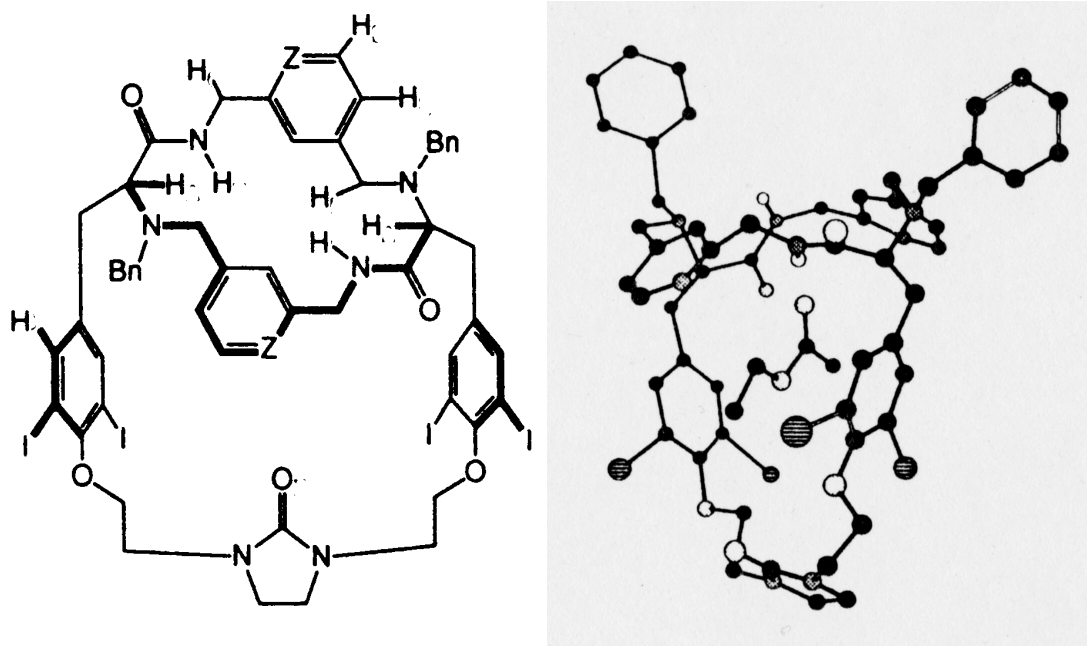


Abb. 11: Intermolekularer Peptidrezeptor, der chirale Erkennung von geschütztem Alanin und Dialanin zeigt. links: Lewisstruktur des Rezeptors, man erkennt die Diiodotyrosin Bausteine an den Seiten des Makrocyclus (  $Z = \text{C-H}$  oder  $\text{N}$  rechts: Krsitallstruktur des Rezeptors, der ein Molekül Essigsäureethylester einschließ t, dieses ist genauso orientiert wie für die untersuchten Aminosäuren angenommen wird.

Rebek et al. stellten 1991 einen Peptidrezeptor vor, der selber keine Aminosäurebausteine besitzt. Über ein Diaminobenzol wurden zwei Kemp' sche Trisäurederivate, deren Methyl- durch Propylgruppen ersetzt wurden, miteinander verbrückt. Die zwei freien Carboxylate der Trisäure wurden über ein Imid verknüpft wobei an einem Seitenarm das Imid zum Lactam reduziert ist. Dadurch erhält man einen chiralen Wirt, der die Peptide in einer definierten Ausrichtung anlagert ( Abb. 12) . Der Rezeptor ist durch seinen sterischen Anspruch selektiv auf Dipeptide die einen bestimmten Raumbedarf an der zweiten Aminosäure besitzen. So wird *N*- und *C*-geschütztes Leu-Gly nahezu 70mal besser gebunden als Leu-Leu, die Bindungskonstanten zu den gut gebundenen Gästen sind im Bereich von  $10^3$ . <sup>[ 66]</sup>



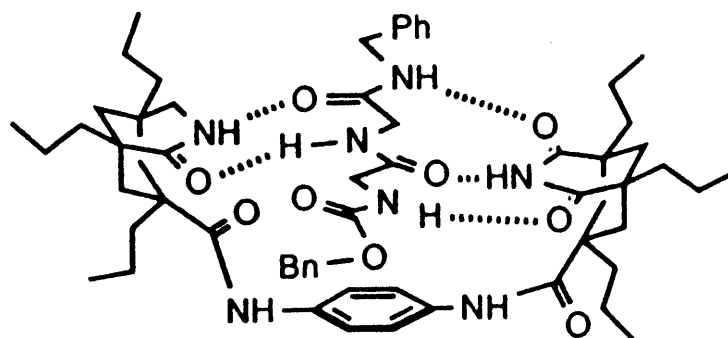


Abb. 12: Wirtmolekül mit den zwei Kemp' schen Trisäurederivaten von Rebek, durch den Raumbedarf erkennt der Rezeptor die zweite Aminosäure selektiv.

Die erste nicht-peptidische Verbindung, die intermolekular ein Dipeptid in die  $\beta$ -Faltblattkonformation drängt, wurde 1996 von Kirsten und Schrader vorgestellt. Dabei handelt es sich um 3-Aminopyrazole und ihre an 3-Position acetylierten Derivate. Eine vertiefende Diskussion dieser Verbindungsklasse als externe Template für das Peptidrückgrat wird in Kapitel 2.1 geführt.<sup>[ 67-68]</sup>

Hamilton stellte 1998 eine weitere Verbindungsklasse vor, die ebenfalls ein Dipeptid in die  $\beta$ -Faltblattkonformation drängen kann. Dabei handelt es sich um ein 1-Alkyl-3, 6-diamino-4-chinolon, welches in der 6-Position acetyliert ist und in 3-Stellung ein Chinolinderivat trägt. Durch diese spezielle Anordnung der Substituenten kann *N*-(*N*-hexanoylglycyl) *L*-Valin über seinen *C*-Terminus gebunden werden; die Assoziationskonstante beträgt in Chloroform  $1.6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Entfernt man im Wirt an der 6-Position die Amidgruppe und bietet als Gast das entsprechend acetylierte Valin an, so ist die Bindungskonstante  $170 \text{ M}^{-1}$ , also 100mal niedriger ( Abb. 13)<sup>[ 69]</sup> Das Entfernen von nur einer Wasserstoffbrücke schwächt also die Bindung enorm.

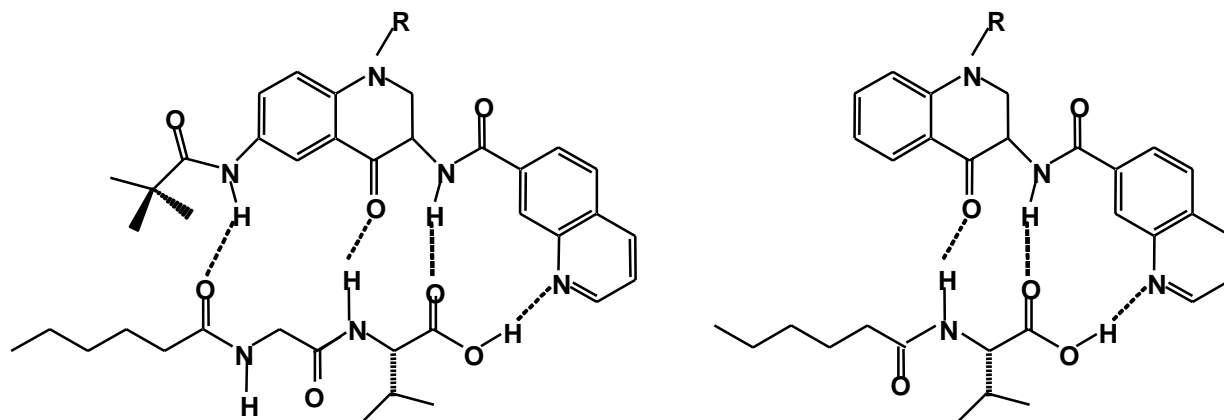


Abb. 13: Rezeptor von *Hamilton*, links: für *N*-geschütztes Gly-Val; das Dipeptid wird über seinen C-Terminus an das Chinolinderivat gebunden und anschließend in der  $\beta$ -Faltblattkonformation fixiert. Rechts: Entfernt man die Bindungsstellen von einer Wasserstoffbrücke zur *N*-terminalen Acylgruppe ist die Bindungskonstante 100mal kleiner.

Eine logische Erweiterung des Systems, welches von *Kelly* eingeführt wurde, sind die Arbeiten von *Kilburn*<sup>[70-71]</sup> (Abb. 10). An der Festphase wird eine Grundeinheit gebunden, die aus einem 2,6-Diaminopyridin besteht. An die freien Aminogruppen wird als erstes Phenylalanin gekuppelt. Bei der kombinatorischen Synthese der beiden peptidischen Seitenarme können anschließend verschiedene Aminosäuren verwendet werden, so daß eine Bibliothek von Rezeptoren entsteht. Zwischen diesen Seitenarmen ist nun genug Platz, um ein Tripeptid zu binden. Dieses wird vom Diaminopyridin über seinen C-Terminus komplexiert (Abb. 14)<sup>[72]</sup>. Die Selektivität des Rezeptors für bestimmte Tripeptide beruht auf dem unterschiedlichen sterischen Anspruch der erkannten Tripeptide.

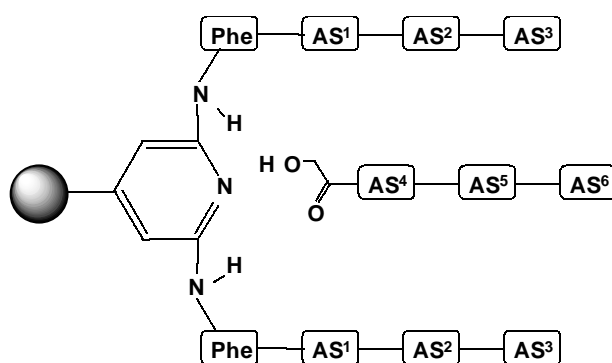


Abb. 14: schematische Darstellung des Rezeptors von *Kilburn* (Kreis: feste Phase, AS: Aminosäure).

Ein ähnlicher Rezeptor wurde kürzlich von *Wennemers* veröffentlicht, bei dem jedoch das Templatrückgrat aus einem Diketopiperazin besteht. Außerdem befindet sich hier das zu erkennende, am N-Terminus acetylierte, Peptid an der Festphase (Abb. 15).<sup>[73]</sup> Nachdem der Rezeptor gegen eine Bibliothek von Peptiden getestet wurde, konnten in Chloroform hohe Selektivitäten gefunden werden. Diese beruhen wahrscheinlich, analog zu denen von *Kilburn*, auf dem sterischen Anspruch der Seitenketten der Aminosäuren.

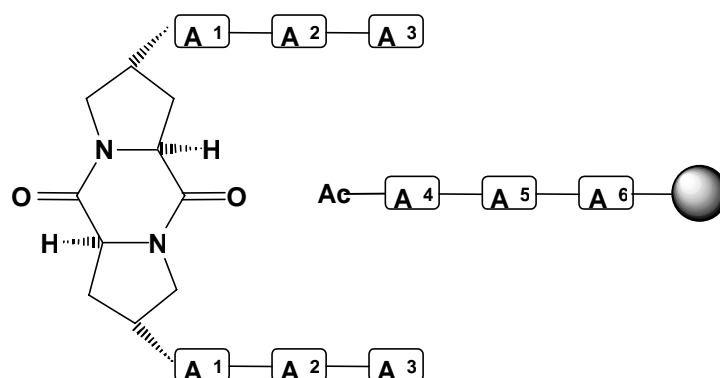


Abb. 15.: Vereinfachte Darstellung des Wirtmoleküls nach *Wennemers* (Kreis: feste Phase, AS: Aminosäure)

Auf dem Gebiet der künstlichen Peptidrezeptoren wird weiterhin intensiv geforscht, wobei die Erkennungseinheit der Wirtverbindung häufig selbst aus Aminosäuren besteht. Daß zwei Peptidstränge sich gegenseitig komplexieren können, gerade wenn Teile von ihnen inß-Faltblatt vorliegen, ist jedoch schon seit langem bekannt.

Nicht-peptidische intermolekulare Komplexe, wie die von *Hamilton* und *Rebek* sind selten vertreten, obwohl diese für das Verständnis der Komplexierung besonders interessant sind. Die Anordnung von Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren, kann bei diesen Wirtverbindungen chemisch drastischer variiert und optimiert werden als bei der Verwendung von Aminosäuren. Außerdem werden kurze Peptide im menschlichen Körper schnell metabolisiert, was bei Verwendung von nicht-natürlichen Bausteinen viel langsamer geschieht. Deshalb sind Rezeptoren, die nur natürliche Aminosäuren enthalten, für eine potentielle pharmazeutische Anwendung weitgehend ungeeignet.

Alle vorgestellten Wirtverbindungen nutzen von ihrem Design her lediglich die Wasserstoffbrücken zum Peptidrückgrat aus und entsprechende Komplexe sind lediglich in unpolaren Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Chloroform stabil.

Die Selektivität der bisher bekannten Peptidrezeptoren für bestimmte Sequenzen beruht also vor allem auf sterischen Effekten. Eine definierte Bindung an die Seitenketten der Aminosäuren, so wie es in natürlichen Rezeptor-Substrat-Komplexen der Fall ist, findet nicht statt.

## 2. Theoretischer Teil

### 2.1. Problemstellung

In unserem Arbeitskreis wurden die ersten literaturbekannten nichtpeptidischen Rezeptormoleküle hergestellt, welche in der Lage sind, *intermolekular* Dipeptide zu komplexieren. Die höchsten Bindungskonstanten ergaben sich mit *N*-acetylierten und *C*-Methyl-veresterten Peptiden. Bei den Rezeptormolekülen handelt es sich um 5-Methyl-3-aminopyrazole und verschieden acylierte Derivate, welche die Peptide in der  $\beta$ -Faltblattkonformation stabilisieren. Dabei konnte durch NMR-Experimente und Kraftfeldrechnungen gezeigt werden, daß das Peptidrückgrat zunächst von oben durch drei und darauf von unten durch zwei Wasserstoffbrücken gebunden wird (Abb. 16) [ 67-68].

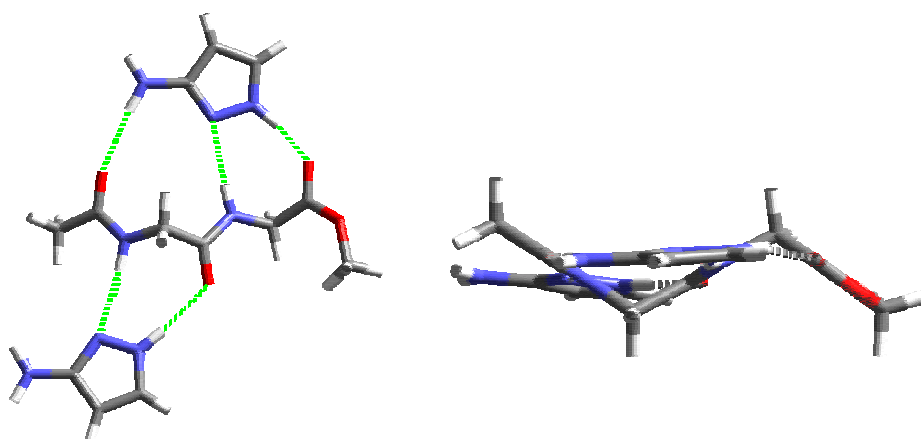


Abb. 16: Berechneter Komplex von Gly-Gly mit zwei Aminopyrazolen ( Cerius Dreiding 2.2.1, Kraftfeldminimierung in der Gasphase)

Die Acylierung der primären Aminogruppe des Aminopyrazols hatte eine signifikante Erhöhung der Komplexbildungskonstante zur Folge. So bindet 5-Amino-3-methylpyrazol in Chloroform lediglich mit  $10 \text{ M}^{-1}$  an Ac-Val-Val-OMe **1**, wohingegen 3-Trifluoracetyl-5-methylpyrazol **2** bereits eine Bindungskonstante von  $890 \text{ M}^{-1}$  aufweist. Dies kann durch die starke Polarisierung des Wasserstoffs an der Amidbindung erklärt werden, welches durch den starken  $-I$ -Effekt der Trifluoracetylgruppe eine hohe positive Partialladung trägt; damit ist diese N-H-Gruppe ein wesentlich besserer Wasserstoffbrücken-Donor als die primäre Aminogruppe.

Untersuchungen mit verschiedenen Dipeptiden zeigten, daß die Bindungskonstante proportional zum Grad der Vororientierung des Peptids im  $\beta$ -Faltblatt steigt. Durch seine sterisch anspruchsvollen Reste hat Val eine größere Tendenz, in der  $\beta$ -Faltblatt-Konformation vorzukommen als Gly. Das entsprechende Dipeptid **1** liegt deshalb auch unkomplexiert bereits vorwiegend in dieser Konformation vor, während dies bei Ac-Gly-Val-OMe nicht der Fall ist. So bindet 3-Methacyloylamino-5-methylpyrazol (MAMP) mit  $80 \text{ M}^{-1}$  an **1** und lediglich mit  $24 \text{ M}^{-1}$  an Ac-Gly-Val-OMe (Abb. 17).

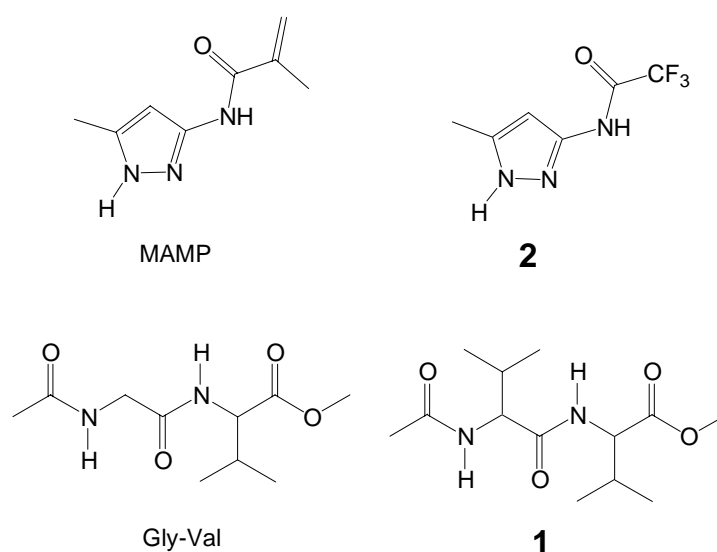


Abb. 17: In der Literatur beschriebene und in Komplexeierungsexperimenten eingesetzte Peptide und Pyrazolderivate

Die nächste Generation von Peptidrezeptoren sollte diesen Nachteil nicht besitzen und auch an das Rückgrat eines Oligopeptids binden, welches schlechter vororientiert ist.

Bei der Bildung des Komplexes fungieren als Wasserstoffbrückendonoren (D) die Protonen an den Stickstoffatomen, als Akzeptoren (A) im Wirt das freie Stickstoffatom, im Peptid die Carbonylsauerstoffatome.

Betrachtet man die Bindung des Pyrazols (DAD) an ein Dipeptid (ADA) mit der entsprechenden Abfolge von Donoren und Akzeptoren, so fällt auf, daß diese ein komplementäres Bindungsmuster besitzen (Abb. 18).

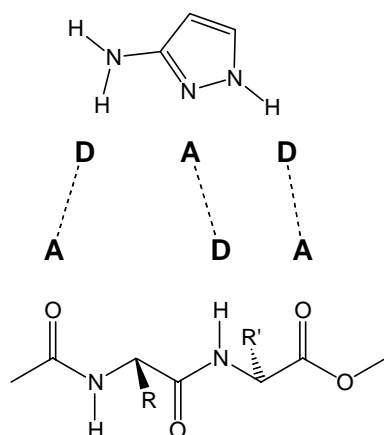


Abb. 18: Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Pyrazol und Peptidrückgrat mit komplementärer Donor-Akzeptor-Konfiguration

Weil im Rahmen dieser Arbeit an der Struktureinheit des Pyrazols festgehalten werden soll, sei an dieser Stelle die annulare Tautomerie (Prototopie) dieses Heterocyclus erwähnt. Damit ist gemeint, daß der N-H-Wasserstoff im Ring an beiden Stickstoffen eine ähnlich große Aufenthaltswahrscheinlichkeit besitzt. Dadurch verändert sich das Bindungsmuster des Pyrazols erheblich. Betrachtet man die Abfolge von Donor- und Akzeptorstelle in den beiden Tautomeren, so erkennt man, daß im 5-Aminopyrazol eine DDA-, im 3-Aminopyrazol eine DAD-Anordnung vorliegt (Abb. 19).

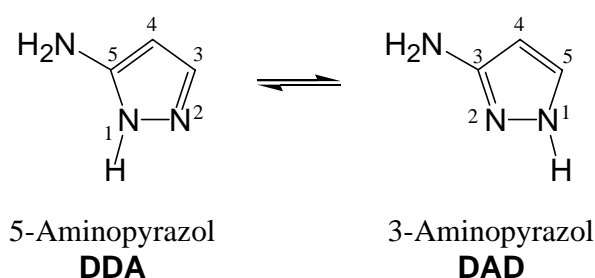


Abb. 19: Die beiden Tautomere des Aminopyrazols mit ihrem Wasserstoffbrückenbindungsmuster

In der Literatur wird die Frage, welches der beiden Tautomere überwiegend vorliegt, kontrovers diskutiert, <sup>[74-75]</sup> bis heute konnte sie nicht eindeutig geklärt werden, genauso wenig wie der Einfluß von Lösungsmittelleffekten.

Zur Peptidbindung ist lediglich das 3-Aminopyrazol befähigt. Es ist also anzunehmen, daß das Tautomerengleichgewicht bei der Komplexbildung auf die entsprechend begünstigte Seite verschoben wird. Deshalb wird in dieser Arbeit lediglich das „richtige“ 3-Tautomer angegeben.

Ausgehend von diesen Vorarbeiten sollen im Rahmen dieser Arbeit zwei getrennte Ansätze verfolgt werden.

Erstens soll die freie Bindungsenthalpie im Komplex zu einem Peptidstrang erhöht werden, so daß auch eine Bindung in polareren Lösungsmitteln als dem bisher verwendeten Chloroform möglich ist. Außerdem sollen die neuen Rezeptoren universell an Oligopeptide binden, auch an jene, die schlecht in der  $\beta$ -Faltblatt-Konformation vororientiert sind. So sollen einmal natürliche Peptide in Wasser gebunden werden. Ein starker  $\beta$ -Faltblattbinder könnte auch in der Alzheimertherapie eingesetzt werden.

Zweitens soll das Bindungsmotiv des Pyrazols so erweitert werden, daß neben dem Peptidrückgrat auch die spezifische Seitengruppe einer Aminosäure selektiv gebunden wird. Über rationales Design soll ein neuer modularer Bausatz von maßgeschneiderten Peptidrezeptoren entwickelt werden. Um die Leistungsfähigkeit dieses Konzepts zu belegen, sollen unterschiedliche Wirtverbindungen hergestellt werden, die jeweils eine andere nicht-kovalente Wechselwirkung, zusätzlich zu den drei Wasserstoffbrücken, ausnutzen.

## 2.2. Erhöhung der freien Bindungsenthalpie

Durch eine höhere Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wirt und Peptidrückgrat sollte sich die Affinität des Rezeptors zum Peptid erhöhen lassen. Bei der Komplexierung eines Tetrapeptids können theoretisch zwei Aminopyrazole von der Oberseite und zwei weitere von der Unterseite insgesamt elf Wasserstoffbrücken ausbilden (sechs von oben, fünf von unten) (Abb. 20).

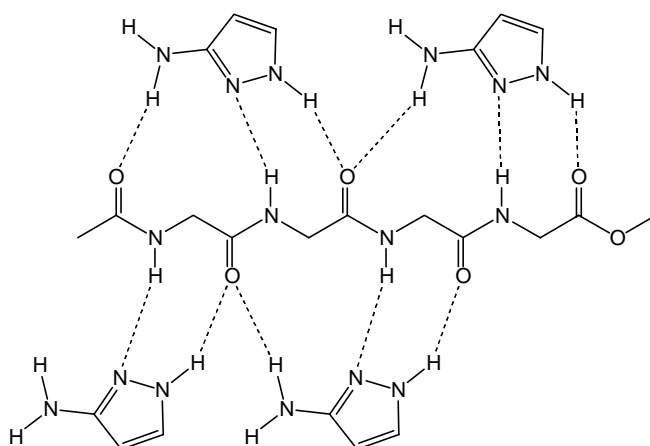


Abb. 20: Komplex von vier Aminopyrazolen, die an ein Tetrapeptid binden; zwei von der Oberseite mit sechs, zwei weitere von der Unterseite mit fünf H-Brücken gedreht.

Bei dieser Komplexierung ist der Entropieverlust jedoch enorm, da fünf Moleküle einen geordneten Komplex eingehen müssen.

Dieses Problem ließ sich umgehen, wenn statt der vier nur zwei Wirtmoleküle bei der Komplexierung dieselbe Anzahl von Wasserstoffbrücken ausbilden könnten. Dabei müßten die Pyrazole idealerweise so vororientiert sein, daß sich das freie Wirtmolekül und das Komplexierte in der Anzahl der Rotationsfreiheitsgrade möglichst wenig unterscheiden. Dies läßt sich dadurch realisieren, daß zwei Aminopyrazole durch geeignete rigide Spacer verknüpft werden.

Dabei ist zu beachten, daß die verknüpften Pyrazole ein DADDAD-Wasserstoffbrückenmuster besitzen, ein Tetrapeptid jedoch an seiner Oberseite eine ADADA-Struktur besitzt. Um eine komplementäre Konfiguration zu erreichen, sind mehrere Lösungsansätze möglich.<sup>[76-77]</sup> Die schlechteste Lösung würde die Ausbildung von nur drei Wasserstoffbrücken zulassen und die weiteren drei Bindungsstellen im Wirtmolekül ungenutzt lassen (Abb. 21a).

Ein besserer Ansatz wäre die Wahl eines Spacers, der den Donor des zweiten Pyrazols so vororientiert, daß er über den letzten Akzeptor des Peptids zu liegen kommt. So könnten immerhin vier Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Allerdings wäre der Komplex wahrscheinlich nicht wesentlich stärker als der Literaturbekannte. Nachteilig ist ebenfalls, daß die ungepaarten Bindungsstellen weitere Wechselwirkungen eingehen könnten, das Ausbilden eines definierten Komplexes also erschwert oder Oligomerenbildung gefördert würde (Abb. 21b).

Die vielversprechendste Möglichkeit ist es, die beiden Pyrazole so zu verknüpfen, daß die beiden mittleren Donoren des Wirtes an lediglich einen Akzeptor des Peptids binden. So könnten alle Bindungsstellen gepaart werden, was das Ausbilden von sechs Wasserstoffbrücken ermöglichen würde. Dies läßt einen starken Komplex erwarten (Abb. 21c).



**Abb. 21:** mögliches Bindungsmuster eines Dimeren Pyrazols an ein Peptid, a.) es werden nur drei H-Brücken ausgebildet, weil die letzten drei Bindungsstellen identisch sind (3 H-Brücken); b.) ein Spacer (---) kann einen Donor so vororientieren, daß dieser über den letzten freien Akzeptor im Peptid zu liegen kommt (4 H-Brücken); c.) die zwei mittleren Donoren binden an den selben Akzeptor im Peptid (6 H-Brücken)



Um die Bedingung zu erfüllen, daß zwei Donoren des Wirtes an einen Akzeptor des Gastes binden, müssen sich die zwei Donorwasserstoffatome nahe nebeneinander befinden. Dabei ist sowohl eine Kopf-Schwanz- als auch eine Kopf-Kopf-Verknüpfung von zwei Pyrazolen denkbar.

Es sind nur wenige in 5-Position substituierte 3-Aminopyrazole literaturbekannt, welche für eine Kopf-Schwanz-Verknüpfung benötigt würden. Um geeignete Monomere zu erhalten mußte zunächst eine mehrstufige Synthese durchgeführt werden.

Einen schnelleren Zugang ermöglichen Kopf-Kopf-verknüpfte Aminopyrazole. Sowohl die Pyrazolderivate als auch geeignete Linker sind kommerziell erhältlich. Aus diesem Grund wurde diese Verknüpfungsvariante gewählt. Weil die acylierten N-H-Donoren in den literaturbekannten Wirtmolekülen gute Komplexierungseigenschaften ergaben, bietet sich eine Pyrazol-Verknüpfung über Amidbindungen an.

Um eine bessere Vorstellung über die späteren Bindungseigenschaften der zu synthetisierenden Wirtmoleküle zu bekommen, wurden für die Wahl des Spacers zunächst Molecular-Modelling-Experimente durchgeführt. Es zeigte sich, daß ein Abstand von ein oder zwei Kohlenstoffen zwischen den primären Aminen zweier Aminopyrazole optimal ist. Die beste Komplexierung eines Tetrapeptids wurde mit dem Diamid der Oxalsäure berechnet, welches in der Lage sein sollte, sechs Wasserstoffbrücken zum Peptidrückgrat auszubilden ( Abb. 22) .

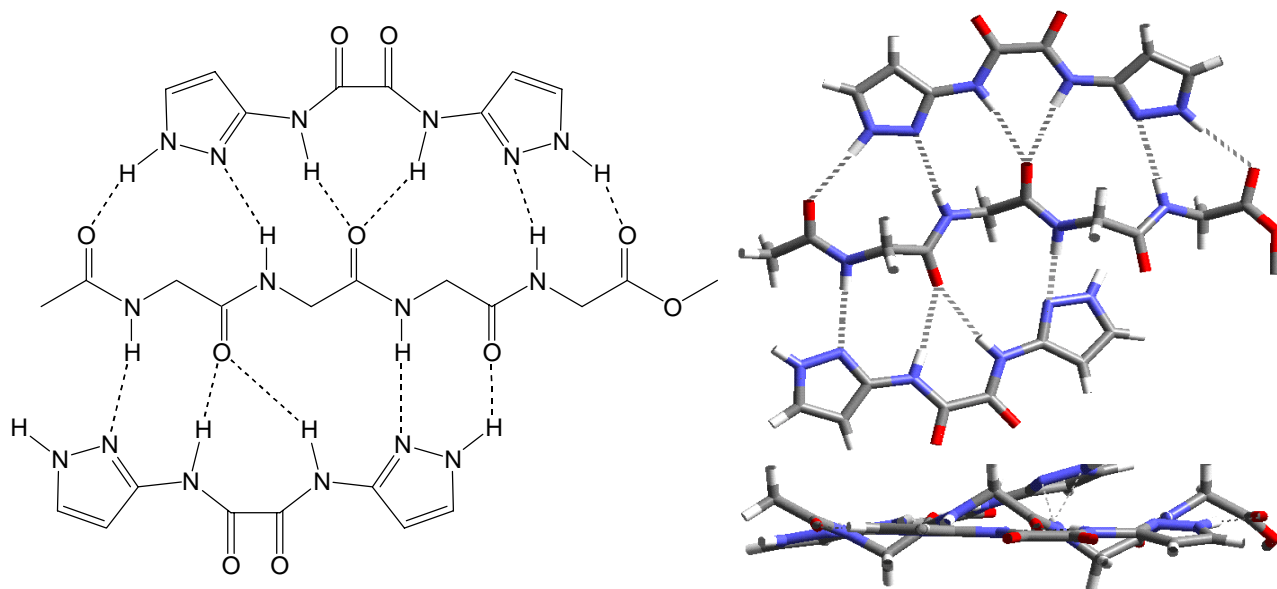


Abb. 22: *links*: Lewis-Struktur des Komplexes eines Oxalsäure verbrückten Aminopyrazoldimers mit N- und C-geschütztem tetra-Glycin, *rechts*: Kraftfeldberechnung; *oben*: Seitenansicht, die berechneten Wasserstoffbrücken sind zu erkennen; *unten*: Aufsicht, das Peptid ist in der  $\beta$ -Faltblattkonformation fixiert, der untere Wirt ist leicht gegen den anderen verschoben ( Ceriuz<sup>2</sup>, Dreiding 2.21, Kraftfeldminimierung in der Gasphase) .

Eine weitere vielversprechende Klasse von Spacern stellen aromatische Disäuren dar, eine resultierende Struktur eines solchen Pyrazoldimers ist am Beispiel des Isophthalsäurespacers in Abb. 23 gezeigt.

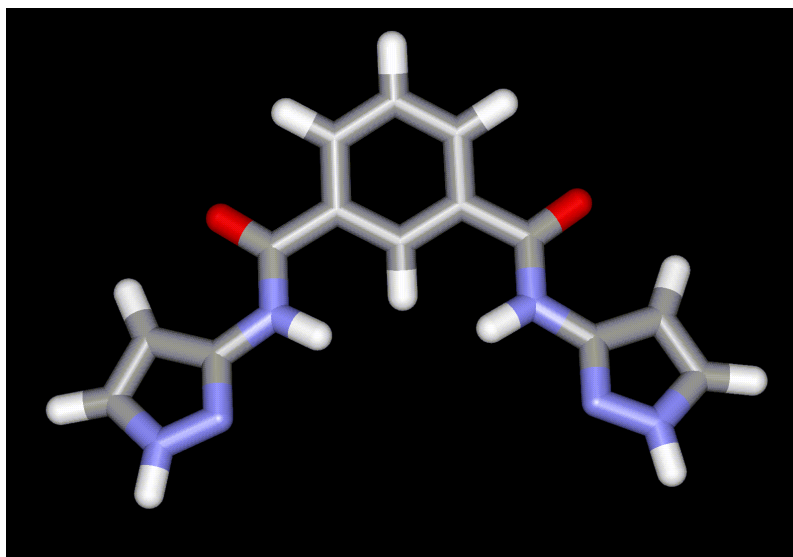


Abb. 23: Berechnete Struktur eines Isophthalsäurediaminopyrazols ( MM, Amber

Durch die Wahl von unterschiedlich substituierten Dibenzoensäuren können unterschiedlich vororientierte dimere Pyrazolbindungsmotive erhalten werden ( Abb 23) . Die so hergestellten Verbindungen sind durch den Aromaten zusätzlich rigide und meist flach gebaut.

### 2.2.1 Synthese der Dimeren

Wie schon in den vorherigen Abschnitten erwähnt, sollten zwei Aminopyrazole amidisch Kopf-Kopf-verbrückt werden, wozu sich Säuredichloride anbieten. Die Stickstoffatome des Pyrazolrings reagieren nucleophil, deshalb müssen diese vor eine Kupplung geschützt werden.

Das kommerziell erhältliche 3-Amino-5-methyl-1*H*-pyrazol wurde mit der Boc-Gruppe N<sub>1</sub>-geschützt,<sup>[ 78]</sup> anschließend durch Standardmethoden zwei Bausteine mit Säurechloriden an der 3-Position verknüpft und mit Trifluoressigsäure Boc-entschützt.<sup>[ 79]</sup>

Die Boc-geschützten Verbindungen wurden in der optimierten Synthese durch Umkristallisation gereinigt, weil schon das leicht saure Kieselgel ( pH 7, 5 – 6, 5) die Schutzgruppe vom Ring abspaltet. Die freien Pyrazole können aufgrund ihrer hohen Polarität nicht säulenchromatographisch aufgereinigt werden, weil sie bei Verwendung des üblichen Kieselgels nicht eluiert werden.

Weil das Pyrazol im Ring basisch ist, wird es durch die zur Entschützung verwendete TFA protoniert ( Abb. 24) . Dadurch wird das benötigte DAD-Bindungsmuster für eine Komplexierung des Peptidrückgrats zerstört. Deshalb muß nach der Entschützung alkalisch aufgearbeitet werden.<sup>[ 80]</sup>

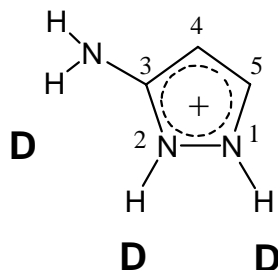


Abb. 24: Protoniertes Pyrazolkation, welches durch Verlust des DAD-Bindungsmusters nicht an ein Peptid binden kann.

Wie auch schon im Modelling gezeigt ( Abb. 22) liegen bei dem Oxalsäureverbrückten Aminopyrazoldimer **3** alle Haftpunkte auf einer Linie. Durch eine Drehung um die C-C-Bindung des Oxalsäurespacers entsteht ein transoides-Konformer, welches für eine Bindung weniger geeignet ist. Eine detaillierte Diskussion der Konformationen und Geometrien der hergestellten Pyrazoldimere wird in 2.4.3 und 2.4.4. geführt.

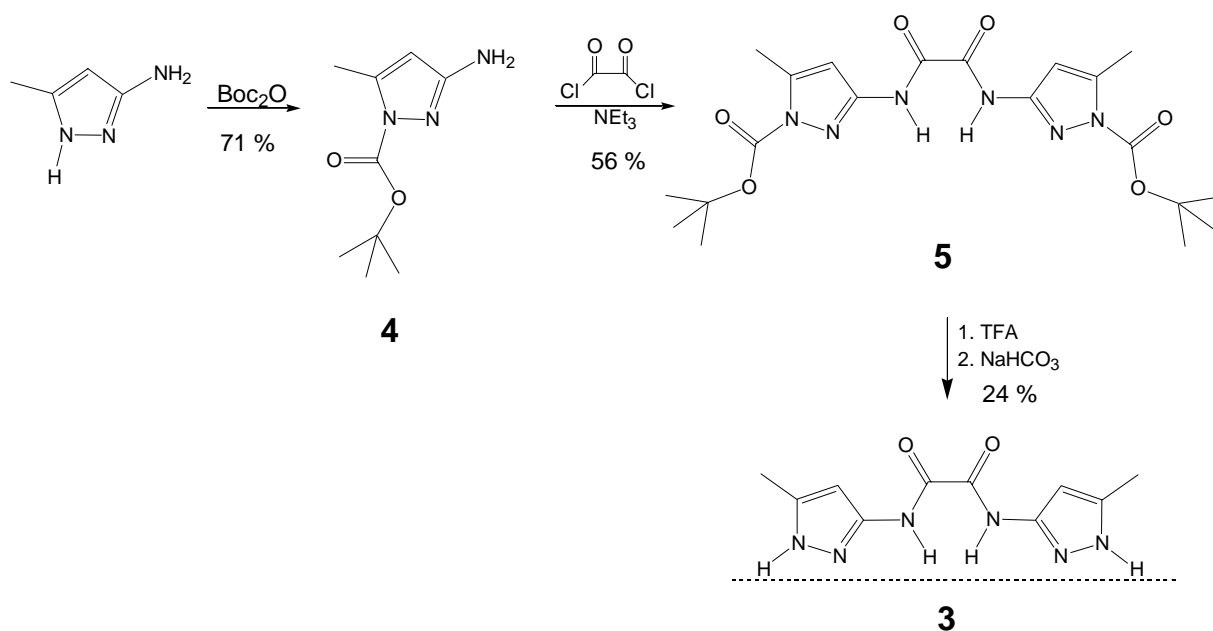


Abb. 25: Synthese des Oxalsäure verknüpften Aminopyrazols **3**, die Haftpunkte liegen auf einer Linie ( gestrichelt) .

Zur Herstellung eines Wirtes mit einem kürzern Spacer wurde aufgrund der besseren Handhabbarkeit Phosgen als 1.93 molare Lösung in Toluol verwendet.

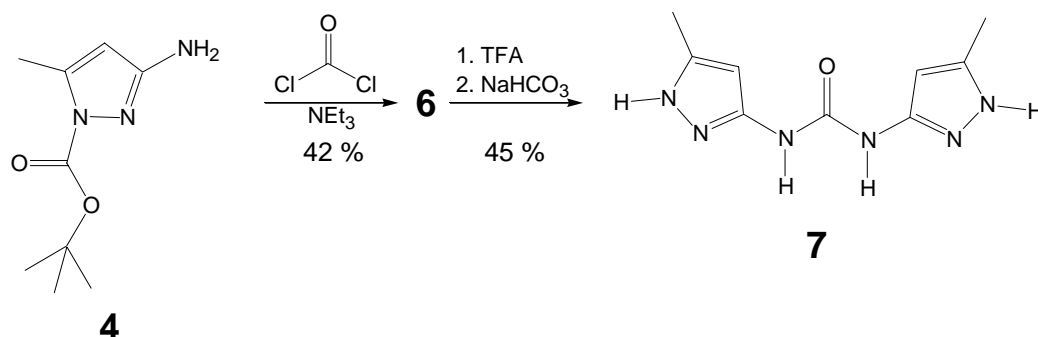


Abb. 26: Darstellung des Harnstoffderivates **7** mit Phosgen

Die berechnete Struktur zeigt, daß die Haftpunkte der Wirtverbindung eine Biegung beschreiben, so daß die Wasserstoffbrückenbindungsstellen nicht optimal vororientiert sind ( Abb. 27, vgl. Abb. 34) .

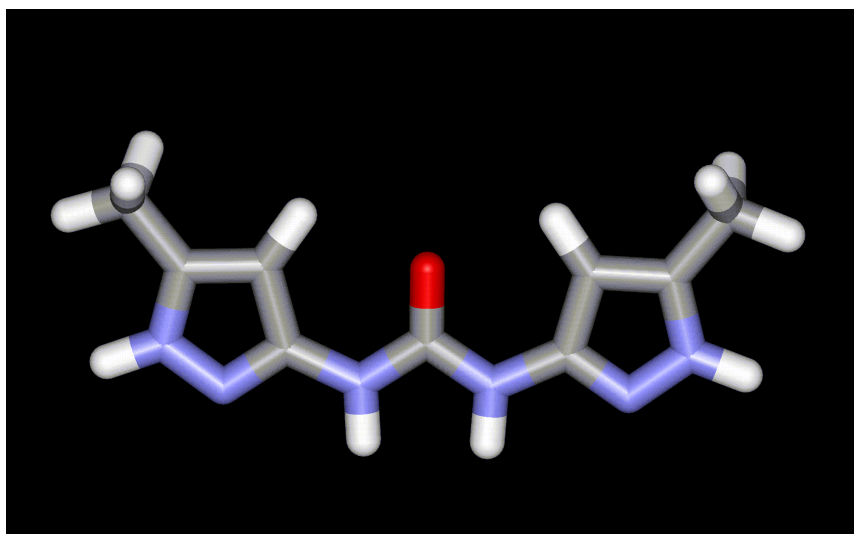


Abb. 27: Berechnete Struktur von **7** ( MM, Amber<sup>\*</sup>)

Wird 2, 2-Dimethylmalonsäuredichlorid für die Knüpfung verwendet so entsteht bei kinetischer Kontrolle nicht das Dimer, sondern durch doppelten Angriff des Amins das entsprechende cyclische Imid von **4**. Um den gewünschten Wirt zu erhalten wird die Reaktion thermodynamisch kontrolliert geführt, indem **4** in siedendem Chlorform vorgelegt und das Säurechlorid langsam zugetropft wird.

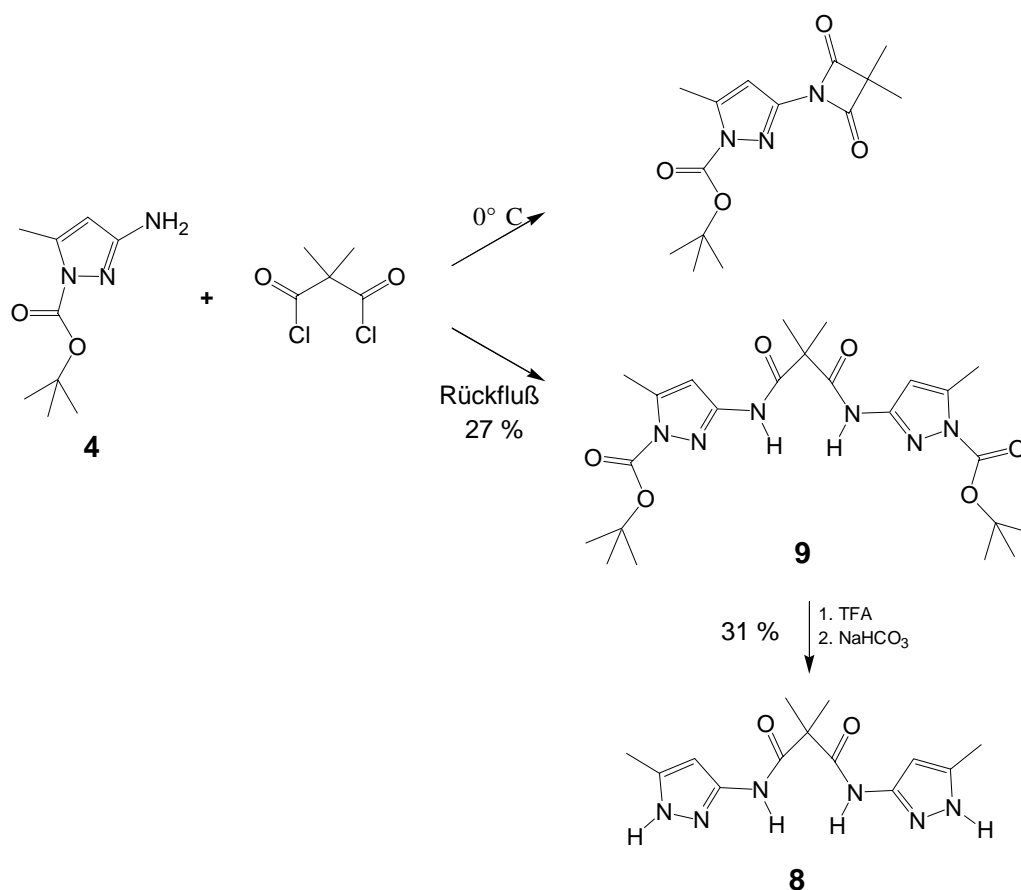


Abb. 28: Darstellung des Dimethylmalonsäuredimers **8**; wird bei der Zugabe des Säuredichlorids unter Eiskühlung gearbeitet, so entsteht ausschließlich das Imid

Durch die beiden vicinalen Methylgruppen des Spacers werden die Seitenarme von **8** wie in einer Falte vororientiert. Dieses könnte evtl. zur Umfaltung eines Peptids aus der  $\beta$ -Faltblatt-Konformation in eine  $\alpha$ -Helix genutzt werden (vgl. Abb. 37) .

Bei der Verwendung von aromatischen Disäuren als Spacer werden die dimeren Aminopyrazole in der Ebene des  $\pi$ -Systems vororientiert. Die hohe Rigidität des Aromaten vermindert die Freiheitsgrade des Moleküls, woraus ein geringer Entropieverlust bei der Komplexierung folgen sollte.

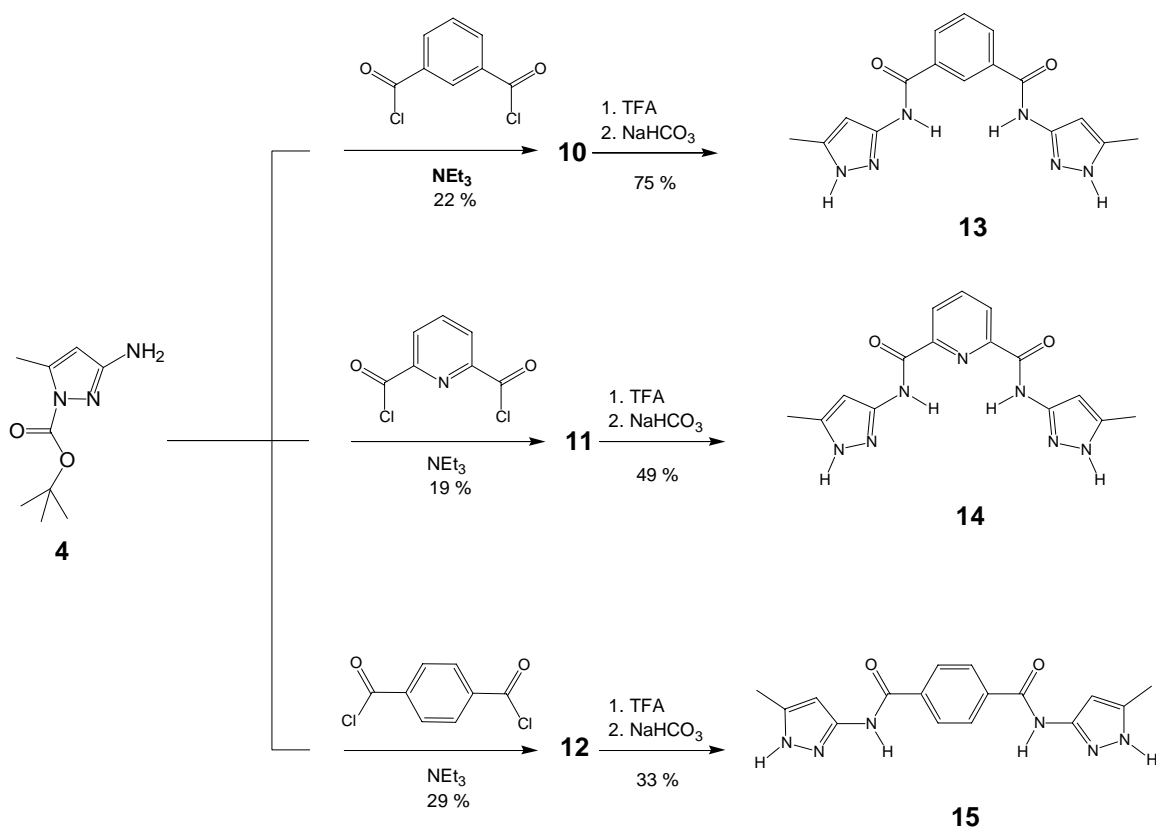


Abb. 29: Aromatische und heteroaromatische Dimere für die Erkennung von Oligopeptiden.

Durch die Wahl des Substitutionsmusters der einzelnen Spacer kann die allgemeine Form des hergestellten Wirtes vorbestimmt werden. So wird im Isophthalsäurederivat **13**, ähnlich wie **beB** (Abb. 28), eine F alte gebildet, der die beiden mittleren Donoren des DADDAD-Bindungsmusters in räumliche Nachbarschaft bringt. Die Verbindung **14** hat durch das Stickstoffatom des Pyridins einen weiteren starken Wasserstoffbrückenakzeptor. Das Wirtmolekül **15** hat aufgrund seiner *para*-Substitution eine ausgedehnte Struktur, die die Pyrazole separiert; eine detailliertere Diskussion der Bindungseigenschaften wird in 2.4.4. durchgeführt.

Das entsprechende ortho-substituierte Phthalsäurederivat wurde nicht hergestellt, weil schon die Berechnungen zeigten, daß die beiden Pyrazole dieser Wirtverbindung durch ihre räumliche Nähe keine Komplexierung mit einem Peptid eingehen können.

### 2.3. Bestimmung der Komplexstabilitätskonstanten mittels $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

Die Lage des Signals eines Protons im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum hängt maßgeblich von seiner elektronischen Umgebung ab. Wenn sich die Ladungsdichte in der Nähe der Protonen eines bestimmten Moleküls verändert, z.B. durch Verwendung von unterschiedlich polaren Lösungsmitteln, so verändert sich auch die Lage der Signale. Das Ausmaß einer solchen Verschiebung hängt wiederum von der Polarisierbarkeit eines bestimmten Kerns ab. So ändert sich die chemische Verschiebung von Amidprotonen bei unterschiedlich polaren Lösungsmitteln sehr stark, weil sich die Elektronen im Amid leicht zum Carbonylsauerstoff verschieben lassen; aromatische Protonen reagieren hingegen weniger empfindlich, weil das aromatische System nicht so polarisierbar ist.

Bei der Anlagerung eines Gastes an einen Wirt unter Ausbildung eines supramolekularen Komplexes verändert sich die chemische Umgebung und damit die Signallage von Wirt- und Gastprotonen; dieses Phänomen wird als komplexierungsinduzierte chemische Verschiebung (CIS) bezeichnet (Abb. 29). Es ist möglich, die Stärke der Komplexbildung quantitativ anhand von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren zu bestimmen. Dabei wird im allgemeinen so verfahren, daß jeweils eine bestimmte Menge Gast vorgelegt wird und eine definierte, ständig steigende Menge Wirt zugegeben wird. Dadurch verändert sich kontinuierlich das Stoffmengenverhältnis  $X = n(\text{Wirt})/n(\text{Gast})$ .

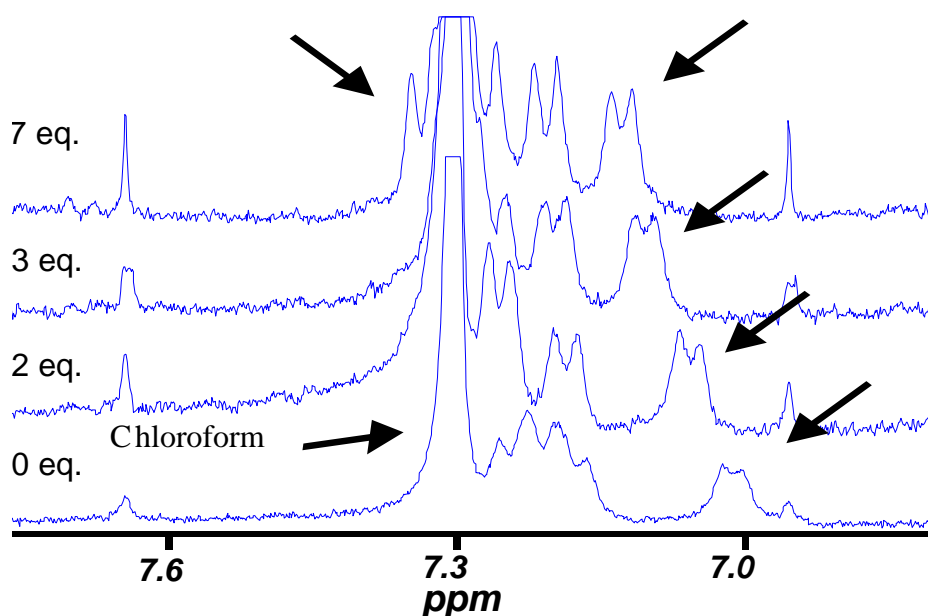


Abb. 29: Stackplot der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von vier Lösungen mit unterschiedlichen Wirt-Gast-Gehalten, nach Zugabe von 0, 2, 3 und 7 Äquivalenten von Ac-Ala<sub>4</sub>-OMe **16** (von unten nach oben); zu erkennen ist der CIS der vier N-H-Protonen von **16** im Verlauf der NMR-Titration, bei 7 eq ist ein N-H-Signal unter dem CH<sub>3</sub>-Signal durch „geshiftet“

Bei der Komplexierung ist der Prozeß von Assoziation und Dissoziation bei Raumtemperatur schnell auf der NMR-Zeitskala. Deshalb resultiert im gemessenen Spektrum, ein beobachtetes Signal  $\delta_{\text{meß}}$  welches lediglich aus dem Mittelwert von freier ( $\delta_0$ ) und komplexierter ( $\delta_{\text{Komplex}}$ ) Spezies für die jeweiligen Wirt-Gast-Verhältnisse ( Gl. 1) besteht.

$$\delta_{\text{meß}} = \frac{[\text{Gast}] - [\text{Komplex}]}{[\text{Gast}]} \cdot \delta_0 + \frac{[\text{Komplex}]}{[\text{Gast}]} \cdot \delta_{\text{Komplex}} \quad (1)$$

Die Auftragung der Differenz von  $\delta_{\text{meß}}$  und  $\delta_0$  ( $\Delta\delta$ ) gegen das Stoffmengenverhältnis ergibt eine Sättigungskurve ( Abb. 30) , die sich asymptotisch dem Wert  $\Delta\delta_{\text{max}}$  annähert ( Abb. 4) . Dieser Wert entspricht der chemischen Verschiebung des beobachteten Gastprotons im reinem Komplex. Die Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{ass}}$ , die sich aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt ( Gl. 2) , kann aus ( Gl. 1) und ( Gl. 2) über eine nicht-lineare Regression bestimmt werden.

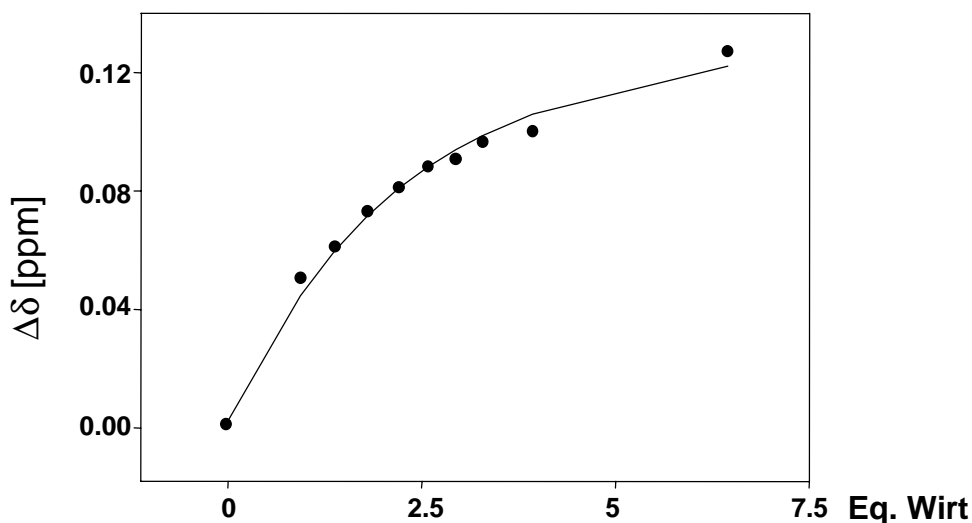


Abb. 30: typische berechnete Bindungskurve am Beispiel von **14@16**

Die in diesem Teil angegebenen Bindungskonstanten werden auf Grund der Fehlergrenzen auf die letzte Stelle gerundet, der genaue Verlauf der NMR-Titrationen kann dem Anhang entnommen werden. <sup>[ 81-84]</sup>



### 2.3.1 Komplexstöchiometrie

Die Komplexstöchiometrien wurden zusätzlich durch Job-Plot-Experimente ermittelt. Dazu werden ebenfalls  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Gemischen aus Wirt und Gast vermessen. Diese werden in unterschiedlichen Verhältnissen zusammen gegeben, wobei die Gesamtkonzentration  $j$  edoch konstant gehalten werden muß. Als Meßgröße dient die Veränderung der chemischen Verschiebung der Signale ( CIS ), welche bei beiden Komplexpartnern verfolgt werden kann.

Trägt man die Differenz der beobachtet Verschiebung  $\Delta\delta$  multipliziert mit dem Molenbruch von Wirt und Gast gegen den Molenbruch auf, so gibt das Maximum der Kurve das Verhältniß von Wirt zu Gast bei maximaler Komplexkonzentration an. Ist das Maximum beispielsweise bei 0.5, so liegt also ein 1: 1-Komplex vor ( Abb. 31)<sup>[85-87]</sup>.

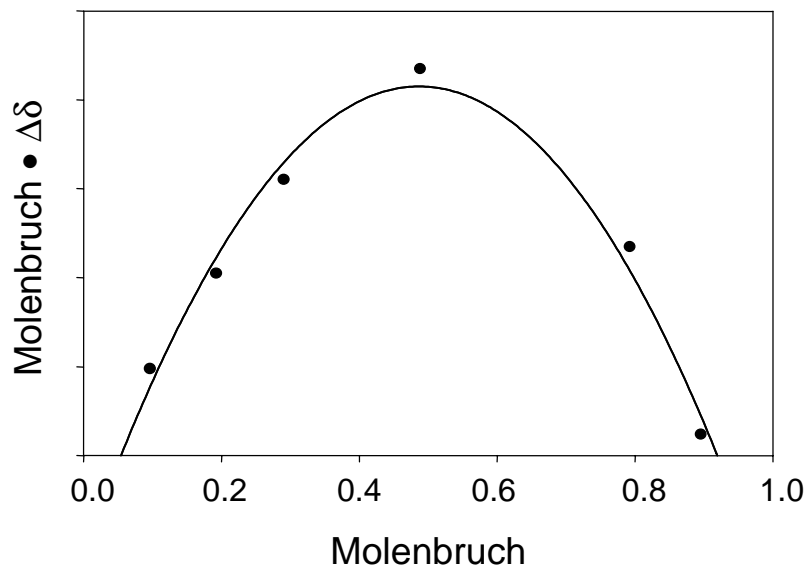


Abb. 31: berechneter Job-Plot von **14**@**16**, das Maximum bei 0.5 beweist, daß es sich um einen 1: 1-Komplex handelt.

## 2.4. Bindungseigenschaften der Dimere

### 2.4.1. Vorüberlegungen

Die Bindungseigenschaften der neuen Aminopyrazoldimere wurden mit Hilfe von NMR-Titrationsuntersuchungen untersucht. Dazu wurden jeweils die Bindungskonstanten in Komplexen verschiedener Wirte mit der Gastverbindung **16** untereinander verglichen. Als Peptid wurde tetra-Ala ausgewählt, weil es schlechter als andere, wie zum Beispiel tetra-Val, in der  $\beta$ -Faltblatt-Konformation vororientiert ist. Dieser allgemeine und anspruchsvolle Ansatz setzt also keine besondere Vororientierung mehr voraus und sollte sich auf beliebige Peptide übertragen lassen. So kann sicher gestellt werden, daß die verwendeten Rezeptoren an jedes Peptidrückgrat binden und nicht lediglich an jene, die für eine Bindung vororientiert sein müssen. Analog zu den Untersuchungen von *Kirsten* wurde das Peptid vorgelegt und der CIS der Amidprotonen verfolgt, die sich als gute Sonden für die Komplexbildung erwiesen haben.

### 2.4.2. Verwendetes Lösungsmittelgemisch

Die hergestellten Wirtverbindungen sind in reinem Chloroform nicht löslich, so daß die NMR-Titrationsuntersuchungen in  $\text{CDCl}_3$  mit 6%  $\text{DMSO-d}_6$  gemessen werden mußten. Die Polarität ( $\epsilon$ -Wert) dieses binären Lösungsmittels verhält sich jedoch nicht linear zum Mischungsverhältnis sondern beschreibt eine Glockenkurve.<sup>[88]</sup>

In Abb. 6 kann man erkennen, daß bei einer geringen Zugabe von DMSO zu Chloroform die Polarität zunächst steil ansteigt und bei weiterer Zugabe das Lösungsmittelgemisch sogar polarer wird als reines DMSO (Abb. 32). Dieses Phänomen wird dadurch erklärt, daß eine Wasserstoffbrücke vom C-H-Proton des Chloroforms zum S=O-Sauerstoff des DMSO ausgebildet wird. Dadurch entsteht ein Lösungsmittelgemisch, welches völlig andere Eigenschaften als die jeweiligen einzelnen Komponenten besitzt.<sup>[89-91]</sup>

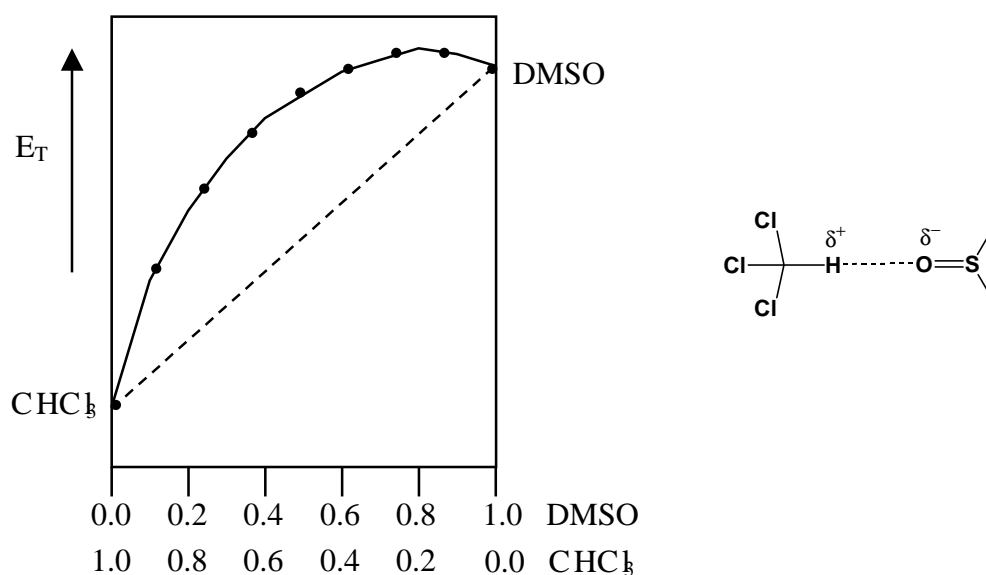


Abb. 32: links: Abhängigkeit des  $E_T$ -Wertes vom Mischungsverhältnis  $\text{CHCl}_3$  : DMSO; Die gestrichelte Linie deutet den theoretischen linearen Verlauf an. rechts: H-Brücke zwischen  $\text{CHCl}_3$  und DMSO.<sup>[ 88]</sup>

Der  $E_T$ -Wert des gewählten Lösungsmittelgemisches würde bei linearer Abhängigkeit einem Anteil von 20% DMSO entsprechen. Das verwendete Medium ist also wesentlich polarer, die zu erwartenden Bindungskonstanten daher deutlich kleiner, als es der Gehalt von 6% DMSO erwarten läßt.

DMSO geht als ein starker Wasserstoffbrückenakzeptor mit den einzelnen untersuchten Komplexpartnern ebenfalls Wasserstoffbrücken ein. Diese kompetitive Assoziation zu dem Lösungsmittel sollte die beobachtete Bindung stark schwächen. Von Kirsten durchgeführte Bindungsstudien ergaben, daß bei Zugabe von geringen Mengen DMSO zu Chloroform keine CIS beobachtet werden konnten.

#### 2.4.3. Bindungseigenschaften der nicht aromatischen Dimere

Trotz des relativ polaren Lösungsmittelgemischs konnte bei den hergestellten Pyrazoldimeren eine Komplexierung mit **16** beobachtet werden. Die Assoziationskonstanten der Dimere mit nicht-aromatischen Spacern sind in Abb. 33 gezeigt.

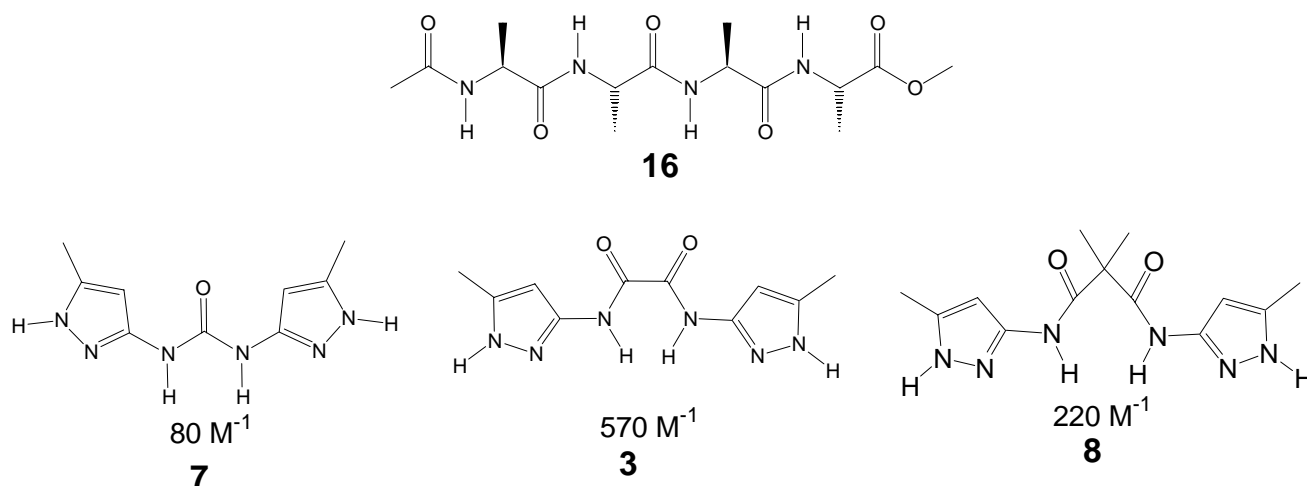


Abb. 33: Bindungskonstanten des Komplexes von **3**, **7** und **8** mit **16**.

Die Untersuchung von **7@16** ergab eine Bindungsstärke von  $80 \text{ M}^{-1}$ . Die amidischen Protonen der zentralen Harnstofffunktion stehen parallel zueinander. Durch diese starre leicht ungünstige Geometrie kann nur eines der Pyrazolringe seine Bindungen mit zwei Aminosäuren von **16** eingehen. Es ist wichtig zu berücksichtigen, daß Wasserstoffbrückenbindungen als gerichtete Kräfte stets eine optimale Orientierung zwischen Donor und Akzeptor benötigen und bei geringen Abweichungen von der Optimalkonfiguration schnell an Einfluß verlieren.<sup>[92-93]</sup> Das Amber\*-Kraftfeld berücksichtigt diese zwar auch, weist aber als Wasserstoffbrücken nur solche aus, die einen bestimmten Energiebetrag überschreiten. Sie sind in den Abbildungen als grüne gestrichelte Linien symbolisiert (Abb. 34). Im Fall des Komplexes von **16@7** findet das Kraftfeld nach Monte-Carlo-Rechnungen nur vier Wasserstoffbrücken.

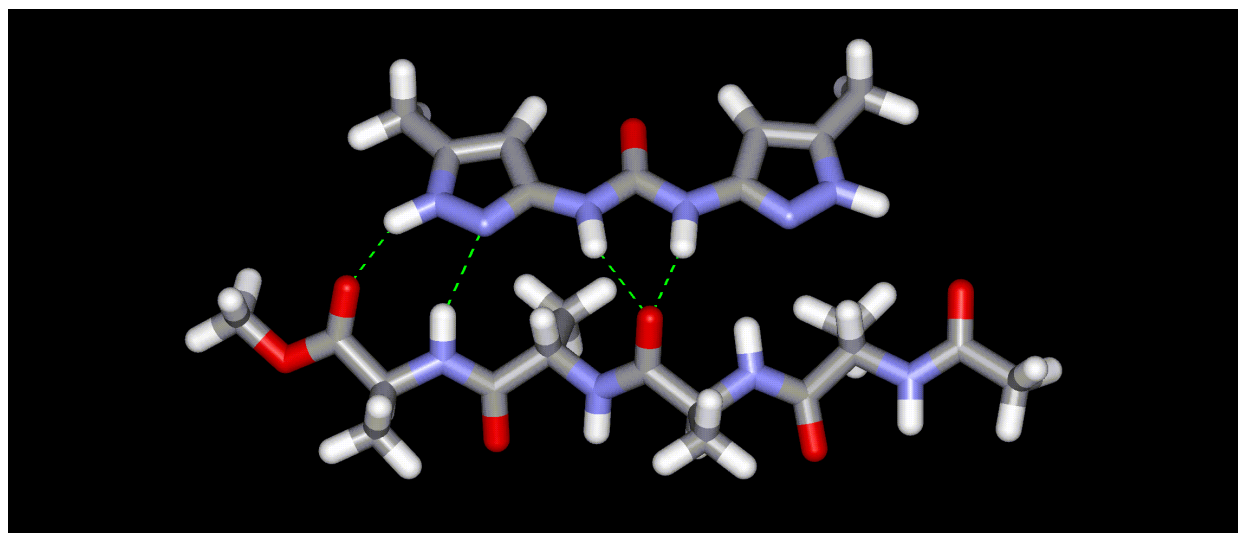


Abb. 34: berechneter Komplex von **7**@**16**; die Bindungsstellen des rechten Pyrazols stehen im ungünstigen Winkel zum Peptidrückgrat, so daß insgesamt 4 H-Brücken ausgebildet werden können (MM, Amber<sup>\*</sup> MC) .

Im Vergleich zu den Dipeptidkomplexen mit den Aminopyrazolmonomeren von *Kirsten* wird hier also nur eine zusätzliche Wasserstoffbrücke ausgebildet. Diese weitere nicht-kovalente Wechselwirkung reicht aber aus, um zum ersten Mal auch einen CIS in Anwesenheit von DMSO zu produzieren.

Um eine bessere Anordnung der Bindungsstellen zu erhalten, wurde Verbindung **3** synthetisiert. Bei **7** weisen die beiden Amidprotonen in die gleiche Raumrichtung. Dies ist bei **3** nicht notwendigerweise der Fall, denn es liegt in zwei unterschiedlichen Konformationen vor, wobei in einem die Amidprotonen *cisoid* stehen, in dem anderen *transoid* (Abb. 35) .

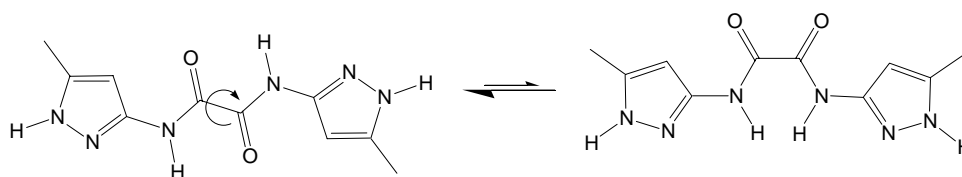


Abb. 35: Lewis-Struktur der beiden Konformere von **3**, die durch Drehung um die C-C-Bindung im Oxalylspacer ineinander übergehen. Das Gleichgewicht liegt nach den Rechnungen auf der linken Seite (MM, Amber<sup>\*</sup> MC) .

Lediglich in der *cisoiden* Struktur können alle sechs postulierten Wasserstoffbrücken zur Oberseite des Peptidrückgrats ausgebildet werden (Abb. 22) . Das *transoide* Konformer könnte zwar mit jeweils einem Amidopyrazol einen Peptidgast binden. Dies ergibt aber nur die bekannte Dreipunkthaftung, welche in DMSO nicht stabil ist.

Bei der NMR-Titration von **3**@**16** wurde eine Assoziationskonstante von  $570 \text{ M}^{-1}$  bestimmt. Dies läßt sich nur so erklären, daß deutlich mehr als drei Wasserstoffbrücken gebildet werden. Einen Hinweis auf die reale Konformation liefert die Kraftfeldrechnung. Wenn die beiden Carbonylsauerstoffe des Oxalylspacers in einer *gestaffelten* Konformation zueinander stehen, um die Abstoßung der Elektronenpaare der Carbonyle zu minimieren (Abb. 36), können fünf einzelne Wasserstoffbrücken zu **16** eingegangen werden. Durch den synergistischen Effekt dieser weiteren Wechselwirkung resultiert eine sechsmal höhere Bindungskonstante als bei **7**@**16**.

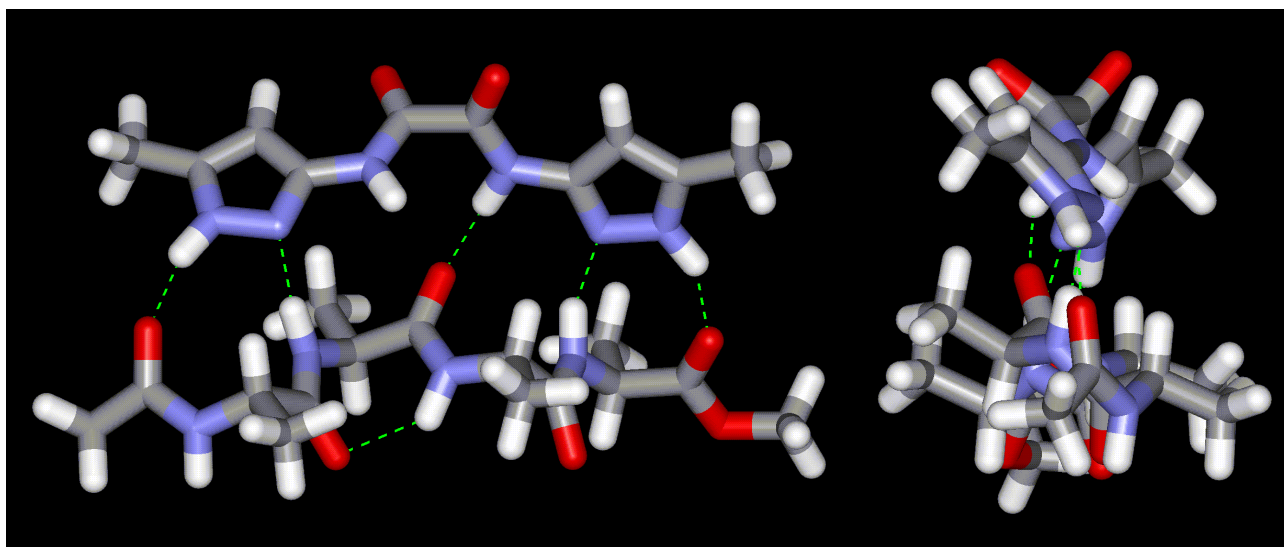


Abb. 36: Optimierter Bindungsmodus von **3**@**16**; die beiden Carbonylsauerstoffe stehen im Komplex nicht in einer Ebene, sondern „staggered“ zueinander. Trotzdem können fünf Wasserstoffbrücken ausgebildet werden (MM, OPLS-AA)

**3** liefert also einen viel stabileren Komplex mit dem Tetrapeptid, obwohl zur Komplexierung die thermodynamisch ungünstigere *cisoid*e Anordnung der Carbonyle erzwungen wird. Exemplarisch für die nicht-aromatischen Aminopyrazoldimere wurde ein Job-Plot-Experiment durchgeführt, wobei ein 1:1-Komplex in **3**@**16** nachgewiesen wurde.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, haben Soto et al.<sup>[20]</sup> ein Oligopeptid entwickelt, welches in der Lage ist, ausgefallene  $\beta$ -Proteinplaques in vivo aufzulösen. Der postulierte Mechanismus dieses Prozesses ist, daß sich zunächst die dem PrP<sup>Sc</sup> komplementären Aminosäuren an den Teil des PrP<sup>Sc</sup> anlagern, welcher in der  $\beta$ -Faltblattkonformation vorliegt. Im zweiten Schritt wird durch das im Templat eingeführte Prolin ein Knick im Proteinmolekül eingeführt. Dadurch ist diese Verbindung in der Lage, die komplexierten Teile des Plaques in eine lösliche und ungefährliche Form mit erhöhtem  $\alpha$ -Helix-Anteil zu überführen. [94-95]

Um eine Verbindung mit ähnlichen Eigenschaften zu erhalten, wurde **8** synthetisiert. Die beiden Pyrazoleinheiten binden nach Modelling-Studien ebenfalls bevorzugt an ein  $\beta$ -Faltblatt, wobei die

geminalen Methylgruppen des Malonsäurederivats für eine V-förmige Struktur des Wirtmoleküls sorgen. Durch diese räumliche Gestalt könnte **8** einen ersten  $\alpha$ -Helixturn in einem komplexierten Peptid vorbereiten ( Abb. 37) . Die beiden nach oben stehenden Carbonylgruppen des Wirtes würden zusätzlich die nach unten weisenden Amid-N-H-Protonen der  $\alpha$ -Helix binden. Damit wäre **8** ein möglicher Umfaltungskatalysator zwischen  $\beta$ -Faltblatt- und  $\alpha$ -Helixkonformation eines Peptidstrangs.

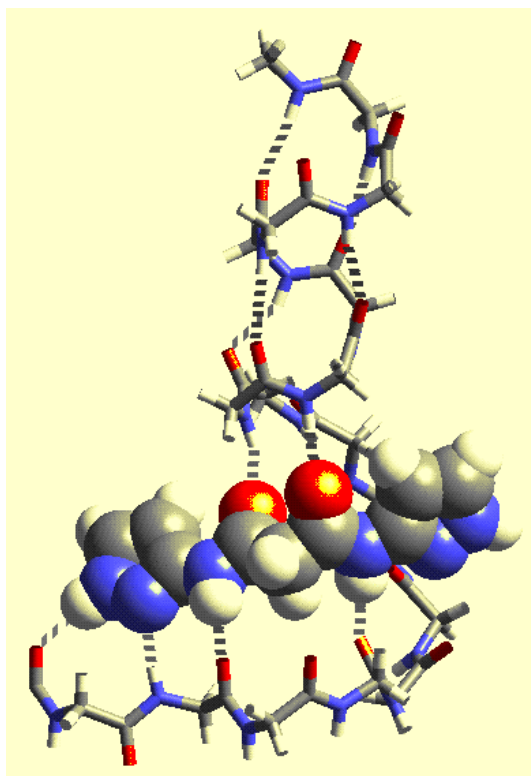


Abb. 37: Bindung von **8** an ein Polypeptid; aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Methylgruppen im Wirt weggelassen ( Ceriuz Dreiding2.21, Kraftfeldminimierung in der Gasphase) .

Die gemessene Bindungskonstante von **8@16** beträgt  $220 \text{ M}^{-1}$ , der berechnete Komplex mit dem Tetrapeptid ist in Abb. 38 gezeigt.

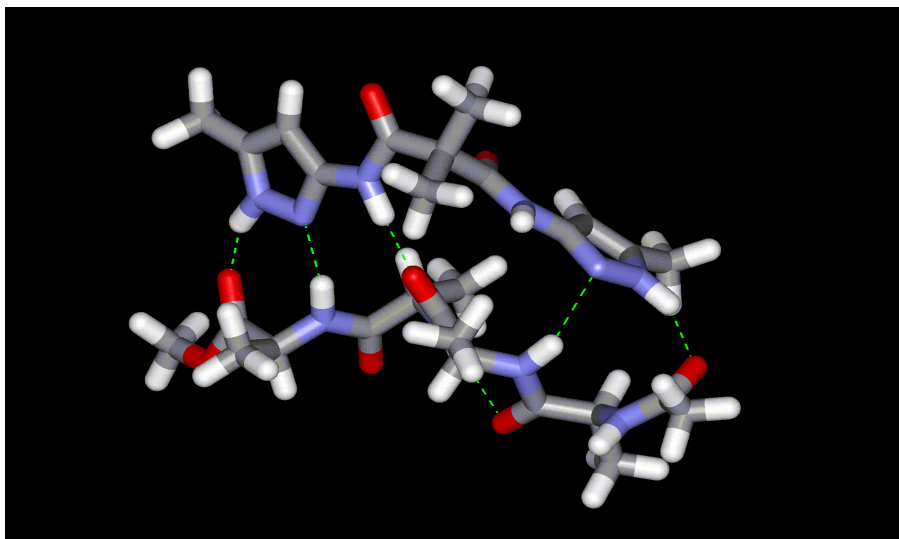


Abb. 38: minimierter Komplex von **8**@**16**, die beiden Pyrazole stehen aus sterischen Gründen syn zueinander, trotzdem können 5 intermolekulare H-Brücken ausgebildet werden, wodurch eine helicale Struktur im komplexierten Peptid induziert wird (MM, Amber\*).

Die V-förmige Struktur von **8** ist also eine Möglichkeit, die Konformation des gebundenen Peptids in Richtung auf eine  $\alpha$ -Helix zu drängen. Für die kleinere Bindungskonstante des Komplexes von **8**@**16** gegenüber dem Komplex **3**@**16** kann der sterische Anspruch der beiden Amidbindungen verantwortlich gemacht werden. Diese stehen in großer räumlicher Nähe, wodurch die Pyrazole ebenfalls gewinkelt zueinander stehen und die Donoren und Akzeptoren im Komplex nicht optimal zueinander ausgerichtet sind.

#### 2.4.4. Bindungseigenschaften der aromatischen und heteroaromatischen Dimere

Die bisher untersuchten Wirtverbindungen zeigten alle die Fähigkeit zur Komplexbildung mit dem Tetrapeptid **16**. Dabei wurden jeweils mindestens vier Wasserstoffbrücken zwischen Wirt und Peptid angenommen. Um diese Argumentation zu untermauern, wurde eine Kontrollverbindung synthetisiert, in welcher die Pyrazole jedoch so angeordnet sind, daß im 1:1-Komplex zu einem Tetrapeptid keine kooperativen Wechselwirkungen auftreten können. Dies wurde durch die Verwendung von Terephthalsäure als Dicarbonsäurekomponente realisiert. Der gewählte Spacer orientiert die beiden Pyrazoleinheiten so vor, daß diese weit voneinander entfernt sind. Dadurch erhält man ein ausgedehntes System, welches durch den sperrigen und rigiden Aromaten die



Anlagerung von einem Tetrapeptid gleichzeitig an beide Pyrazole des Dimers verhindert. Bei einer Bindungsstudie von **15**@**16** wurde wie erwartet kein CIS beobachtet.

Die Bindungskonstanten aller hergestellten Dimere mit aromatischen Spacern sind in Abb. 39 gezeigt.

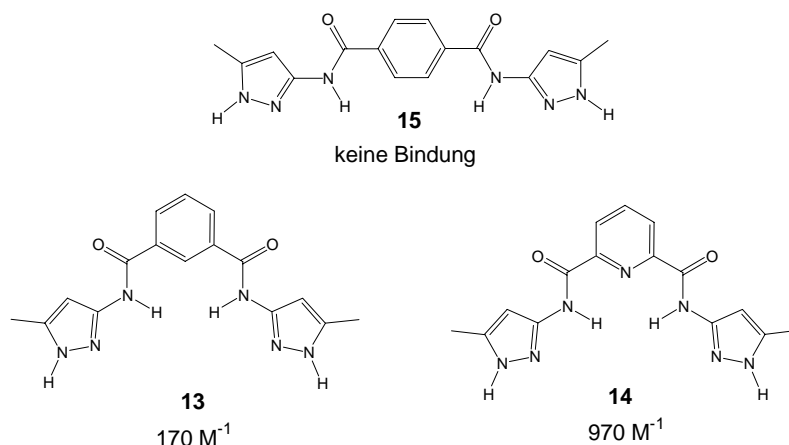


Abb. 39: Bindungskonstanten der hergestellten Dimere mit aromatischen Spacern von **13**, **14** und **15** im Komplex mit **16**.

Bei Verwendung eines Isophthalsäurespacers **13**<sup>[96-97]</sup> kann vermieden werden, daß sich die Pyrazole wie in **8** gewinkelt zueinander anordnen, denn durch konjugative Wechselwirkungen sollten diese in der Ebene des  $\pi$ -Systems des Aromaten liegen. Trotzdem bringt man so die Haftpunkte weiter zusammen als im gestreckten **15**. So zeigen Berechnungen, daß beide Pyrazole an das Rückgrat von **16** binden können. Jedoch können auch bei **13** analog zu **3** zwei Konformere vorkommen, wovon lediglich eines für eine Bindung geeignet ist (Abb. 40).

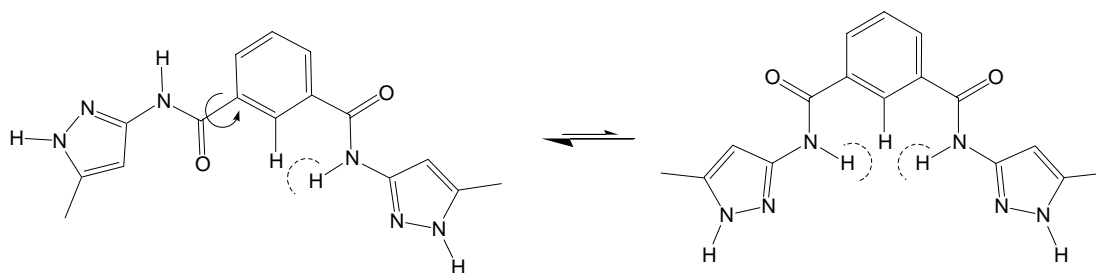


Abb. 40: Lewisstruktur der beiden Konformere von **13**, ein Vergleich der berechneten Konformere zeigt, daß das Gleichgewicht auf der Seite des *transoiden*-Konformers (links) liegt, welches nicht kooperativ an **16** binden kann (MM, Amber MC).

Das einzelne aromatische C-H-Proton übt auf die beiden benachbarten Isophthalamidgruppen einen repulsiven Effekt aus, der das *gauche*-Konformer destabilisiert (Abb. 41)<sup>[98]</sup>.

Die gemessene Bindungskonstante von **13@16** beträgt  $170 \text{ M}^{-1}$ , liegt also in der gleichen Größenordnung wie **3@16** ( $570 \text{ M}^{-1}$ ) und **8@16** ( $220 \text{ M}^{-1}$ ).

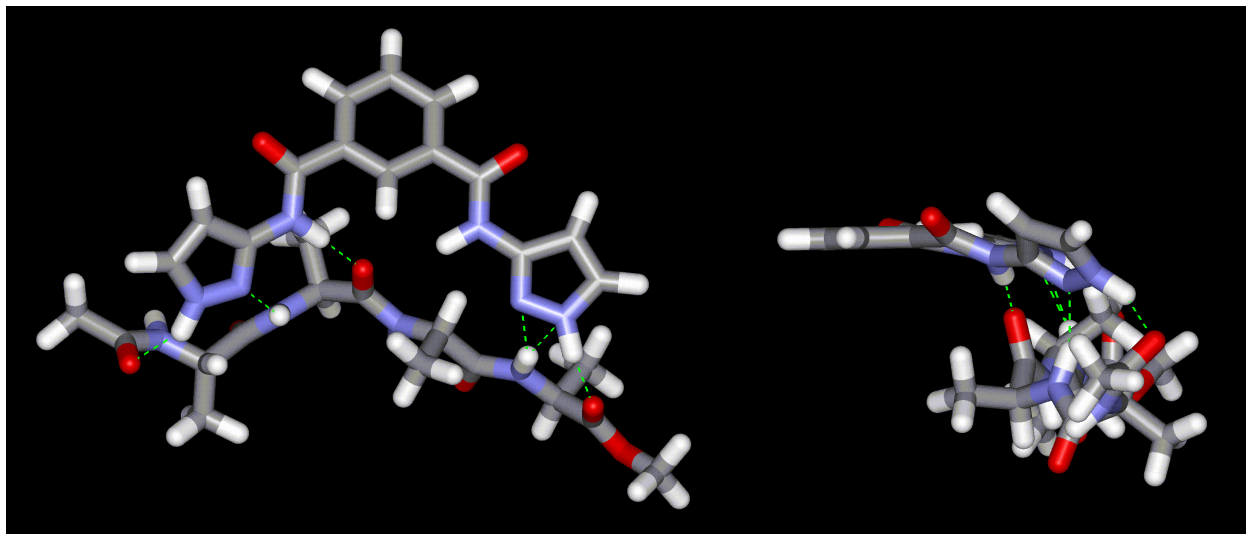


Abb. 41: berechneter Komplex von **13@16**, man erkennt die Ausbildung von 5 bis 6 H-Brücken, die Seitenansicht (rechts) zeigt jedoch, daß diese gewinkelt und damit schwächer sind als im Komplex **3@16** (MM, Ambjør).

Dabei wird das Peptid allerdings in der Rechnung erneut deutlich aus der  $\beta$ -Faltblattkonformation gedrängt. Trotzdem können fünf bis sechs Wasserstoffbrücken ausgebildet werden.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse scheint die V-Anordnung der Seitenarme in **8** und **13** eine kooperative Bindung an das Tetrapeptid zu zulassen. Eine Wirtverbindung in der das *cisoid*-Konformer bevorzugt wird, sollte eine wesentlich stärkere Bindung mit einem Peptid eingehen können als **8**.

Deshalb wird 2, 6-Dicarboxypyridin als Spacer verwendet. Diese Verbindung ist ebenfalls meta-Substituiert und unterscheidet sich von **8** lediglich durch den annularen Stickstoff. es ist bekannt, daß beide Amidprotonen zum freien Elektronenpaar des Pyridinstickstoffs Wasserstoffbrücken ausbilden können und dadurch das *cisoid*-Konformer in unpolaren Lösungsmitteln viel stärker populiert ist, als bei **13** (Abb. 42)<sup>99-101]</sup>.

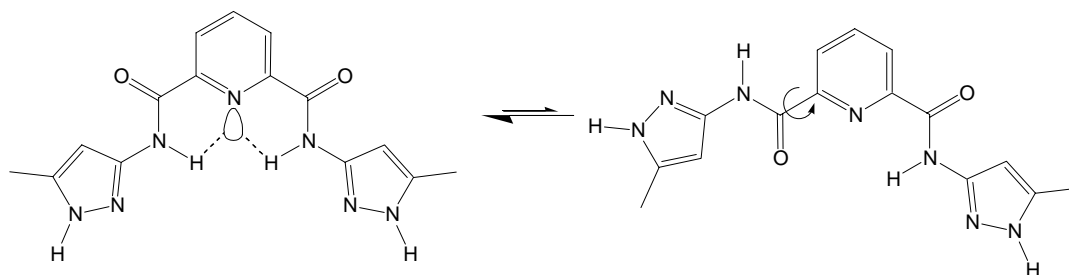


Abb. 42: Lewis-Struktur der beiden Konformere von **14**, durch das Ausbilden von H-Brücken zum freien Elektronenpaar des Pyridinstickstoffatoms wird das für die Komplexierung benötigte *cisoid*-Konformer favorisiert.

Das Experiment bestätigt die Vorüberlegungen überraschend deutlich, denn tatsächlich hat der Komplex **14@16** in Chloroform mit 6% DMSO die bisher größte Bindungskonstante von  $970 \text{ M}^{-1}$ , ein Job-Plot-Experiment ergab, daß es sich um einen 1:1-Komplex handelt. Die Berechnungen des Komplexes zeigen, daß das Peptid mit einem Carbonylsauerstoff in die „Bindungstasche“ hineinragt und bei einer Bindung eine annähernd helicale Struktur annimmt (Abb. 43).

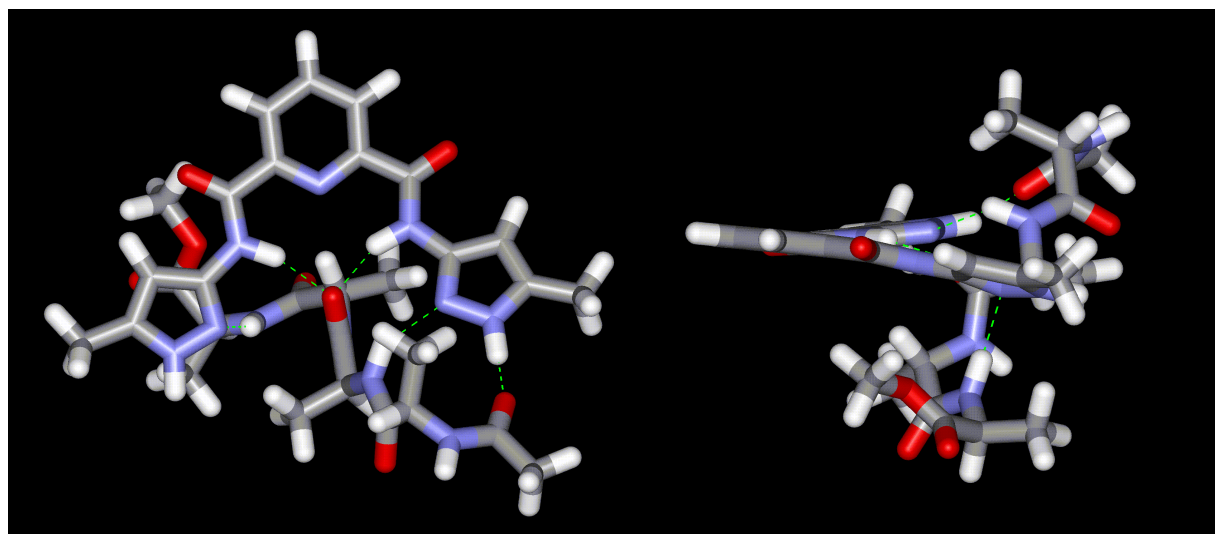


Abb. 43: links: minimierter Komplex von **14@16**, es werden 5 H-Brücken zum Peptidrückgrat ausgebildet, rechts: Seitenansicht des Komplexes, das Peptid wird an seinem mittleren Carbonylsauerstoff in die Bindungstasche gezogen (MM, Amber MC).

In diesem Kapitel wurden die Komplexierungseigenschaften von mehreren dimeren Aminopyrazolen gegenüber einem Tetrapeptid vorgestellt. Dabei seien besonders **3** und **14** hervorgehoben, die die höchsten Bindungskonstanten ergaben. Bei vielen Fällen stimmen die Ergebnisse von Kraftfeldrechnungen qualitativ mit den experimentellen Werten überein.

Die so gewonnenen Erkenntnisse sollen bei der Entwicklung von komplexeren Strukturen angewendet werden, die in Kapitel 2.5 vorgestellt werden.

## 2.5. Erkennung des spezifischen Rests einer Aminosäure im Peptidstrang

### 2.5.1 Vorüberlegungen

Im Rahmen dieser Arbeit soll erstmals ein Baukasten von alphabetischen Modulen für die Erkennung von spezifischen Aminosäuren in Peptiden entwickelt werden. Dabei soll der Rezeptor nicht über einen kombinatorischen Ansatz<sup>[102-105]</sup>, sondern durch rationales Design gezielt hergestellt werden. Um die Anwenbarkeit des Konzepts zu belegen, sollen mehrere Wirtverbindungen entwickelt werden. Diese sollen jeweils zusätzlich zum bekannten Pyrazolbindungsmuster eine weitere nicht-kovalente Wechselwirkung<sup>[106-108]</sup> zur selektiven Erkennung einer bestimmten Seitenkette im Peptid ausnutzen.

Über das von uns entwickelte und bereits bekannte Bindungsmuster im 3-Aminopyrazol soll zunächst das Peptid auf bewährte Weise in der  $\beta$ -Faltblattkonformation fixiert werden. Dadurch ragen die Seitenketten der Aminosäuren in definierter Ausrichtung waagrecht in den Raum hinein. Durch diese Vororientierung kann ein rigider U-förmiger Spacer, der oben am Aminopyrazol angebracht werden soll, eine zweite Haftgruppe nahe an die funktionelle Gruppe der Aminosäureseitenkette heranbringen (Abb. 44). Diese Erkennungsgruppe soll ihrerseits eine zusätzliche attraktive Wechselwirkung mit dem spezifischen Rest einer bestimmten Aminosäure eingehen.

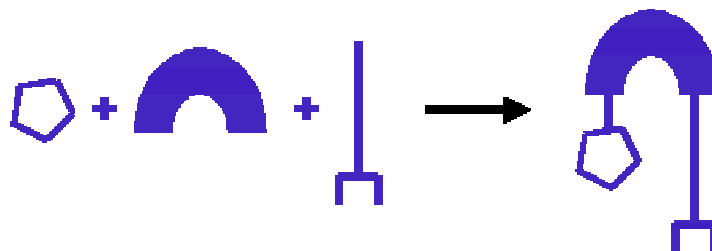


Abb. 44: stilisierter Aufbau des Wirtmoleküls; über ein rigides Rückgrat (Hufeisen) soll ein 3-Aminopyrazol (Fünfeck) und eine Erkennungsgruppe (Gabel) verknüpft werden.

Die Wahl der Haftgruppe ist dabei von fundamentaler Bedeutung, denn sie bestimmt die Selektivität der einzelnen Bausteine. Der übrige Teil des Wirtmoleküls bleibt erhalten.

Das allgemeine Konzept zur Bindung eines Rezeptors an eine bestimmte Seitenkette in einem Peptidstrang wird in Abb. 45 schematisch gezeigt.

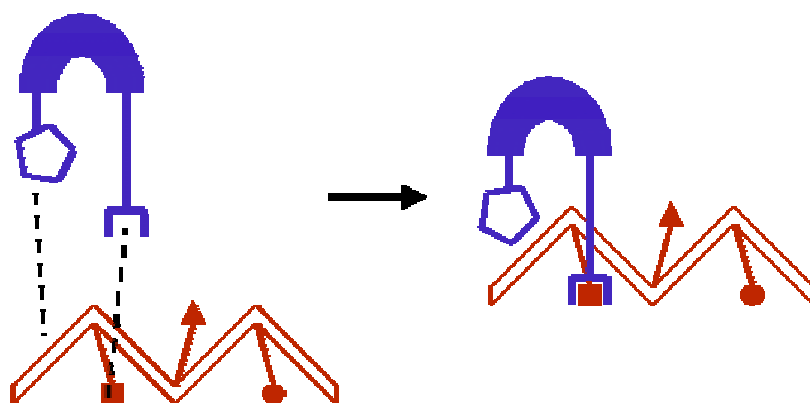


Abb. 45: Spezifische Wechselwirkung eines Rezeptors mit einem Peptidstrang ( 5-Eck: Pyrazol, Peptid: stilisiert gefaltete Form) , die charakteristischen Reste der einzelnen Aminosäuren sind als Quadrat, Dreieck und Kreis symbolisiert. Durch die Wahl des Seitenarms am Wirt ( Gabel) , kann die jeweilige Bindung nur an eine bestimmte Aminosäure erfolgen.

In Abb. 46 wird dieses allgemeine Konzept mit Lewisstrukturen verdeutlicht. Bei der Komplexierung des Peptidrückgrats durch das 3-Aminopyrazol nähert sich die Haftgruppe X des Wirtmoleküls dem Rest Y der Aminosäure und geht eine weitere attraktive Wechselwirkung ein. Bei allen Wirten muß aus Gründen dieser Vororientierung des Peptids an der Bindungsmaske des Aminopyrazols festgehalten werden.

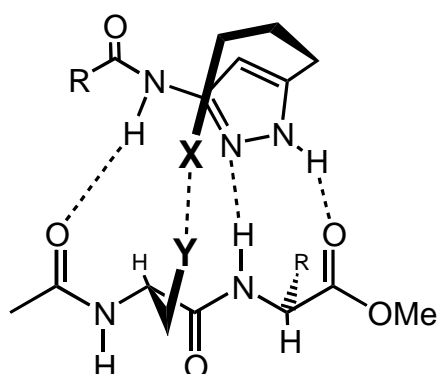


Abb 46.: Bindung des Aminopyrazolwirts mit seiner Haftgruppe X an die Seitenkette Y einer Aminosäure im Peptid.

An den U-förmigen Spacer im Wirtmolekül werden hauptsächlich zwei Ansprüche gestellt. Er muß über zwei konvergent angeordnete funktionelle Gruppen verfügen, die sowohl das Pyrazol als auch die Seitengruppe tragen können und darf selbst keine Wechselwirkungen mit einem Peptid eingehen. Diese Bedingungen erfüllt die 1, 3, 5-Trimethyl-cyclohexan-1, 3, 5-

tricarbonsäure (Kemp'sche Trisäure, Abb. 47).<sup>[109-111]</sup> Sie bietet dem Peptid keinerlei Bindungsstellen, weil sie lediglich aliphatischen Charakter hat. Die Carboxylfunktionen werden durch die am selben Kohlenstoffatom stehenden Methylgruppen sterisch abgeschirmt. Vor allem durch die Gruppe von J. Rebek<sup>[112-114]</sup> ist die Einführung von zwei unterschiedlichen Substituenten an den Carboxylgruppen der Trisäure gut

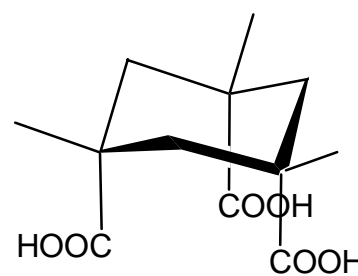


Abb. 47.: Kemp'sche Trisäure

untersucht worden (Abb. 48). Dazu werden im allgemeinen zwei Carboxylate mit einem Amin ( $R-NH_2$ ) zum Imid verknüpft. Diese Funktionalität hat lediglich einen Rotationsfreiheitsgrad um die N-R-Bindung, ist rigide und läßt nur eine Carbonsäuregruppe der Trisäure frei.<sup>[118-119]</sup> Durch diese Reaktionsführung muß keine aufwendige Schutzgruppenchemie<sup>[120]</sup> am teuren Trisäure-Templat durchgeführt werden.

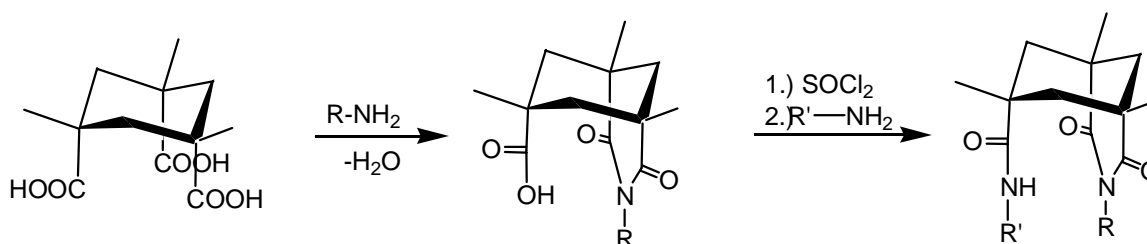


Abb. 48.: Allgemeine Einführung von zwei konvergent angeordneten Substituenten in die Kemp'sche Trisäure nach Rebek.

Bei der Wahl der jeweiligen Erkennungsgruppe im Wirtmolekül spielen drei Faktoren eine Rolle:

Zunächst sollte sie leicht an das bestehende Grundgerüst gebunden werden können und möglichst starr sein. Die erste Bindung wird zum Beispiel durch eine Aminofunktion realisiert, die sich mit Standardmethoden an das letzte, freie Carboxylat der Kemp'schen Trisäure als Amid binden läßt. Die zweite Voraussetzung wird durch einen planaren und rigiden Aromaten erfüllt.

Aufbauend auf diesen Grundüberlegungen können nun zwei prinzipielle Synthesewege beschriftet werden (Abb. 49):

- zunächst wird das geschützte 3-Aminopyrazol als Imid an die Kemp'sche Trisäure gebunden, darauf wird das Anilinderivat amidisch verknüpft.
- zunächst erfolgt die Anbindung des Anilinderivates als Imid und zum Schluß Amidknüpfung mit dem Aminopyrazol.

Problematisch bei der Syntheseführung ist die Tatsache, daß bei Pyrazolen das Ringstickstoffatom sehr nucleophil ist (vgl. 2.2.1). Dieser muß geeignet geschützt werden, damit keine Ringacylierung auftritt.<sup>[121-122]</sup> Dies gilt für beide Reaktionssequenzen.

Gegenüber Variante b) hat Syntheseweg a) den Vorteil, daß zunächst ein allgemeiner Grundbaustein erhalten wird, der die konservierten Strukturmerkmale trägt und in nur einem weiteren Schritt die verschiedenen Zielverbindungen liefert. Bei Variante b) hingegen muß die Synthese also für jedes Wirt neu begonnen werden. Tragen die aromatischen Seitengruppen reaktive Substituenten, würde sich die Synthese weiter verkomplizieren.

Aus diesen Gründen wird Variante a.) favorisiert.

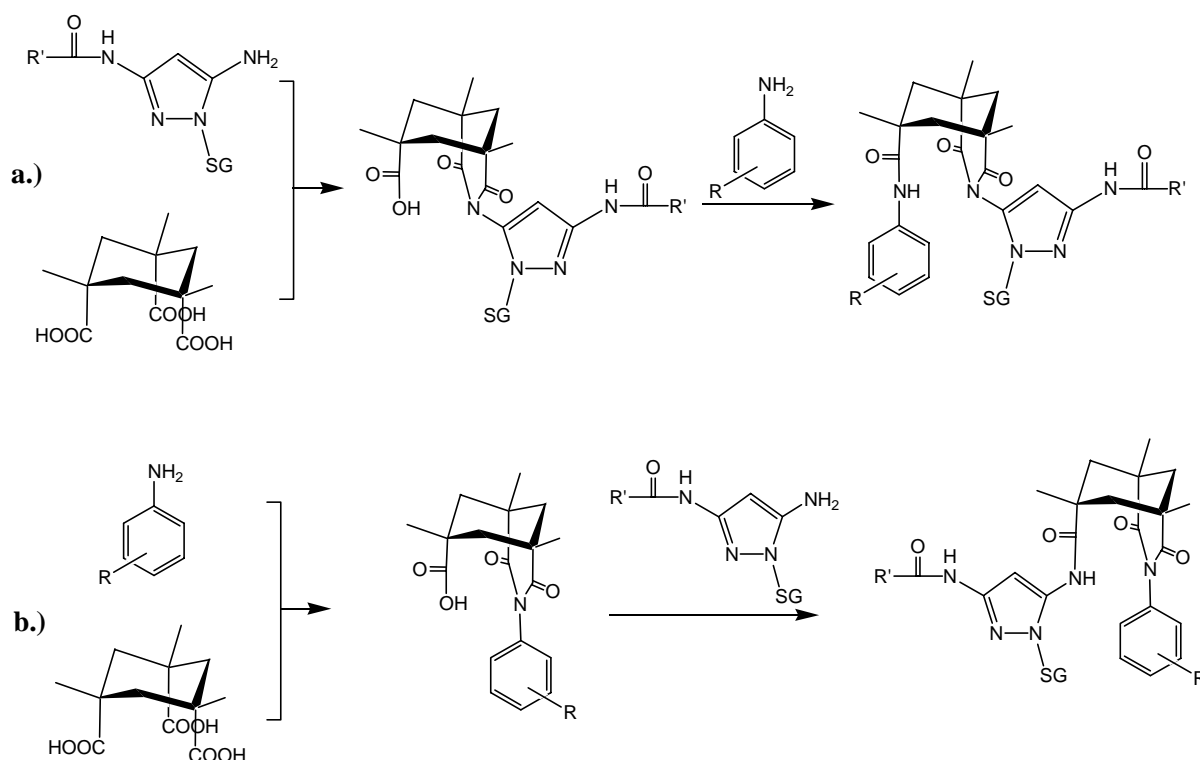


Abb. 49.: Varianten der Synthesestrategie, a.) Die Amidknüpfung des Pyrazols liefert einen Grundbaustein, an den beliebige Anilinderivate in einem Schritt gebunden werden können. b.) die Synthese muß ausgehend von der Kemp' schen Trisäure für jedes Wirtmolekül neu begonnen werden

Damit das Wirtmolekül die eigentliche Wechselwirkung mit dem spezifischen Rest der Aminosäure eingehen kann, muß sich an dem Anilinderivat eine weitere Funktionalität befinden. Hierbei sollte die Anzahl der Freiheitsgrade ebenfalls klein gehalten werden. Es wäre also vorteilhaft, wenn sich diese bindende Einheit direkt am Aromaten befindet. Dabei sind allgemein drei Regioisomere möglich, nämlich die entsprechenden *ortho*-, *meta*- und *para*-Isomere. Am günstigsten wäre die *para*-Substitution, weil sich auch bei einer Drehung

um die Amidbindung die bindende Einheit immer in derselben räumlichen Orientierung befindet, was bei den anderen Substitutionsmustern nicht der Fall ist. Dort geht lediglich ein Rotamer die gewünschte Wechselwirkung mit dem Gast ein. Dieses Problem ließ sich zwar umgehen, wenn doppelt substituierte Derivate gewählt würden; dadurch wären die Rezeptorseitenarme allerdings sterisch anspruchsvoller.

Um das benötigte Substitutionsmuster zu bestimmen, wurden als Werkzeug des rationalen Designs Modelling Studien durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß *meta*-substituierte Aromaten die beste Vororientierung für eine gute Wechselwirkung besitzen. Zusammenfassend kann über den chemischen Aufbau der konstruierten Wirtverbindung folgende allgemeine Aussage getroffen werden (Abb. 50): ein acyliertes Diaminopyrazol für die Bindung an das Peptidrückgrat wird über ein Imid an die Kemp'sche Trisäure geknüpft. An diese wird über die letzte freie Carbonsäurefunktion ein *meta*-substituiertes Anilinderivat für die Erkennung der spezifischen Seitenkette im Peptid gebunden.

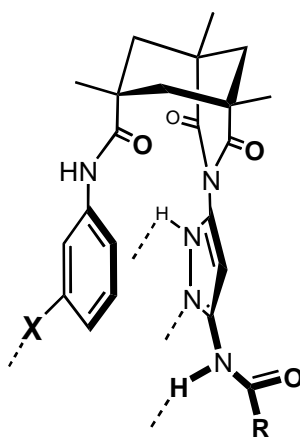


Abb. 50.: Allgemeine Struktur des entworfenen Wirtes zur spezifischen Peptiderkennung.

Bevor die Synthese begonnen wird, muß noch geklärt werden, welche Substituenten für R und X in Abb. 50 gewählt werden sollen. Die stärksten Bindungen des isolierten acylierten Aminopyrazols an Dipeptide wurden von Kirsten gemessen, wenn R = Trifluoracetyl war. Deshalb wird auch für R in den neuen Wirtverbindungen dieser Substituent gewählt.

Zur Klärung der Seitengruppe X muß zunächst überlegt werden, welche nicht-kovalenten Wechselwirkungen untersucht werden sollen und an welchen Aminosäuren dies geschehen soll.

Drei wichtige Typen sind:  $\pi$ -Stapelung, Wasserstoffbrückenbindung und Coulombkräfte. Bevor also eine Entscheidung über X gefällt werden kann, soll für jede der genannten Interaktionen eine Aminosäure als Beispielmolekül ausgewählt werden.



## 2.5.2 Auswahl der zu erkennenden Aminosäuren für die drei nichtkovalenten Wechselwirkungen

### $\pi$ -Stapelung

Zur Untersuchung der  $\pi$ -Stapelung müssen proteinogene Aminosäuren mit aromatischen Seitengruppen geprüft werden. Hierzu stehen Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin zur Verfügung (Abb. 51).

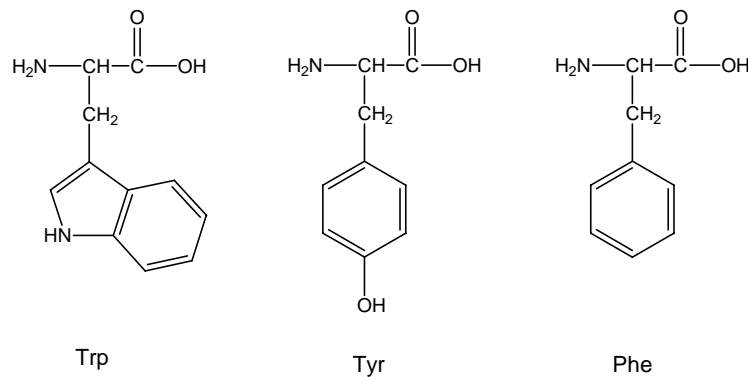


Abb. 51.: Die drei proteinogenen Aminosäuren mit aromatischen Seitengruppen.

Tryptophan hat mit dem Indolrest zwar eine große  $\pi$ -Fläche, dadurch aber auch einen großen sterischen Anspruch. Das Indol-N-H kann zusätzlich als Wasserstoffbrückendonor fungieren. Die Untersuchung einer isolierten  $\pi$ -Stapelung kann mit dieser Seitengruppe nicht durchgeführt werden. Tyr ist kleiner als Trp, jedoch besitzt es ebenfalls mit der Hydroxylgruppe an dem aromatischen System eine zusätzliche Donorfunktionalität. Phe besitzt außer der Methylengruppe zum Peptid keine weiteren Substituenten, ist also für eine reine Komplexierung durch  $\pi$ -Wechselwirkung gut geeignet. Der einzige Nachteil ist sein mäßiger Elektronenreichtum. Die entsprechende Wirtverbindung sollte trotzdem gezielt diese Aminosäure erkennen.

Wie muß nun der Seitenarm des Rezeptors gewählt werden, um mit dem aromatischen Ring von Phe zu wechselwirken? Schon in der Einleitung wurde erwähnt, daß die stärksten Wechselwirkungen von Aromaten untereinander durch den Kontakt von  $\pi$ -Flächen elektronenreicher und elektronenarmer Aromaten entstehen.

Der Rest der gewählten Aminosäure ist durch den kleinen +I-Effekt der Methylenebrücke zum Rückgrat der Aminosäure eher elektronenreich. Der Substituent X in der Seitengruppe des

Wirtes sollte also elektronenziehend sein, so daß ein elektronenarmes aromatisches System vorliegt. Dazu stehen mehrere Verbindungsklassen zur Verfügung, wie beispielsweise Nitrile, Halogene und Nitro-Gruppen. Aus synthetischen Gründen wird auch hier das *meta*-substituierte und damit nur leicht desaktivierte Nitroanilin bei der Darstellung der Wirtverbindung verwendet.<sup>[ 123-125]</sup>

## Wasserstoffbrücke

Zur Untersuchung einer Wasserstoffbrücke bieten sich mehrere natürliche Aminosäuren an. Um den Entropieverlust bei der Komplexierung klein zu halten, sollte die Seitenkette, möglichst wenig Rotationsfreiheitsgrade besitzen, also möglichst kurz sein und sterisch wenig anspruchsvoll ( Abb. 52) .

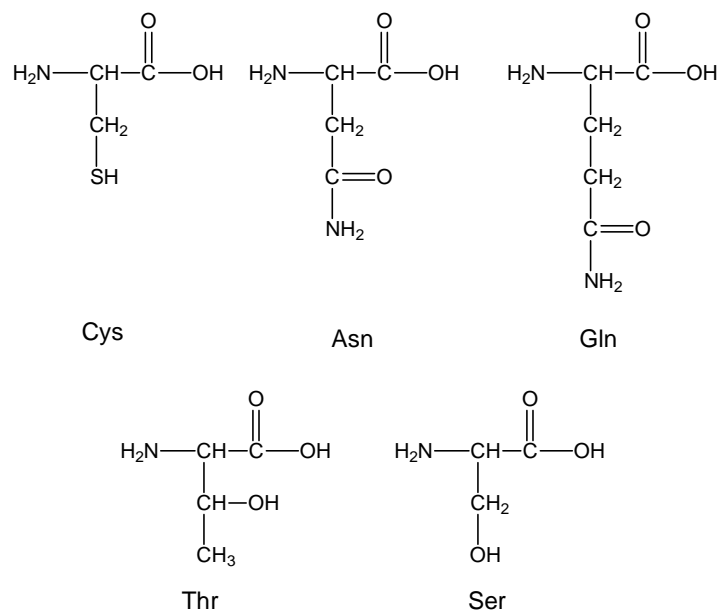


Abb. 52.: Proteinogene Aminosäuren mit schlanken Seitengruppen, die Wasserstoff-Brückenbindungen eingehen können.

Asn und Gln besitzen zwei Partialladungen in ihrer Seitenkette, die bei einer Drehung um die C-C-Achse ihre Position wechseln. Die komplementäre Bindungsstelle des Rezeptors würde so einmal eine attraktive Wechselwirkung eingehen und nach der Drehung wieder abgestoßen werden ( Abb. 53) .

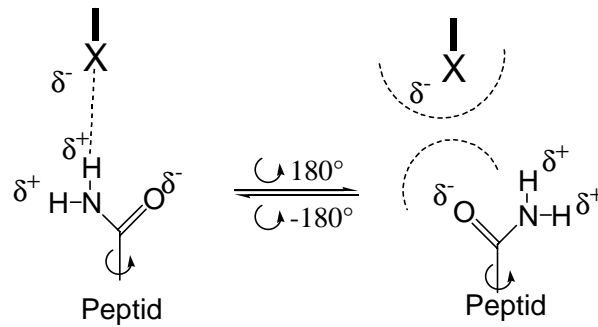


Abb. 53.: Wechselwirkung einer Bindungsstelle X mit der Partialladung  $\delta^-$  und dem spezifischen Rest von Asn bzw. Gln *links*: attraktive nicht kovalente Bindung *rechts*: nach der Drehung stoßen sich die beiden partiell gleich geladenen Substituenten ab.

Bei Cystein besteht die Gefahr der Dimersisierung durch Ausbildung von Disulfid-Brücken. Die Seitenkette von Thr ist sterisch anspruchsvoller als die von Ser, so daß diese Aminosäure für eine Komplexierung am geeignetsten erscheint.

Die Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylfunktion von Ser und dem Seitenarm des Rezeptors soll durch eine Carbonylfunktionen realisiert werden. Synthetisch gut zugänglich kommen diese in Ketonen, Aldehyden und Amiden vor. Die beiden zuletzt genannten besitzen neben der  $-C=O$ -Funktion auch eine  $-X-H^+$ -Gruppe, die zu einer weiteren, unbeabsichtigten Bindung führen kann. Die für Asn und Gln diskutierten Nachteile gelten hier entsprechend. Verwendet man bei der Amidknüpfung sekundäre Amine, so kann dieses Problem umgangen werden, dadurch würde der resultierende Substituent aber auch sterisch anspruchsvoller. Es werden also Ketone für die Wasserstoffbrücke im Komplex eingesetzt (Abb. 54).

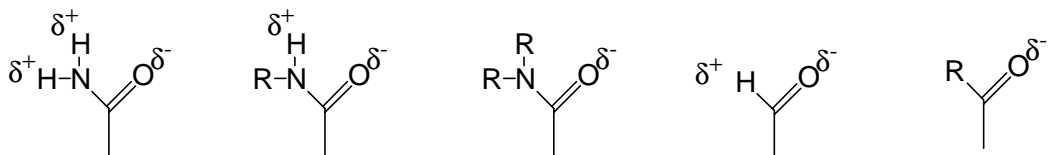


Abb. 54.: Mögliche Seitengruppen mit negativen Partialladungen, Amide und Aldehyde besitzen zwei unterschiedliche Teilladungen oder sind sterisch anspruchsvoll.

Als Anilinderivat zur Bindung an das Grundgerüst des Rezeptors wird auf Grund dieser Überlegungen *meta*-Aminoacetophenon gewählt.

## Coulombkräfte

Es gibt einige natürliche Aminosäuren mit ionischen Seitengruppen, die für eine Untersuchung zur Verfügung stehen ( Abb. 55) .

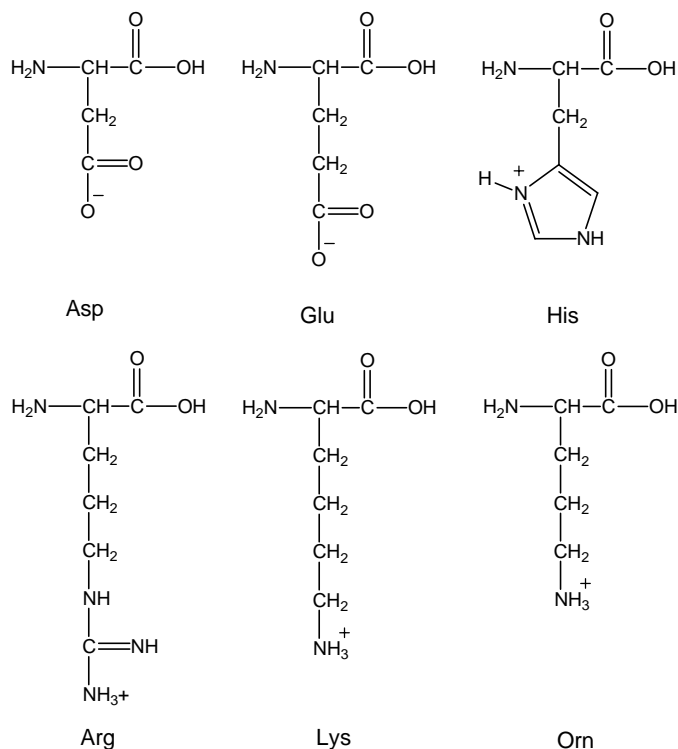


Abb. 55.: Aminosäuren mit ionischen Seitengruppen.

Durch die Basizität des Pyrazols ist die gezielte Einführung einer positiven Ladung im Seitenarm des Wirtes problematisch. Deshalb soll zunächst eine Aminosäure mit einer kationischen Seitenkette erkannt werden.

In der Literatur sind einige chelatartige Rezeptoren für His und Arg beschrieben.<sup>[ 126-128]</sup> Diese gehen starke Bindungen mit dem Imidazolium- beziehungsweise Guanidiniumion ein. Die zu erwartende Bindung eines entsprechenden Seitenarms würde die Komplexierung an das Peptid wahrscheinlich dominieren. Die zusätzliche Wechselwirkung des Pyrazols an das Peptidrückgrat wäre dann nicht mehr meßbar.

Es stehen also nur noch Orn und Lys zur Diskussion. Berechnungen zeigen, daß ein Komplex mit Orn stärker ist als mit Lys, dessen Seitenkette um eine Methylengruppe längere ist.

Für die Komplexierung wird die anionische Bindungsstelle im Wirt durch ein Carboxylat generiert. Dies gelingt zum Beispiel durch Umsetzen einer freien Säure mit Tetrabutylammoniumhydroxid. Das entstehende Salz ist, durch die vier lipophilen

Alkylgruppen des Kations kein Kontaktionenpaar, und deshalb in annähernd jedem organischen Lösungsmittel löslich.

### 2.5.3 Darstellung der Wirtverbindungen

Es sollte eine konvergente Synthese entwickelt werden, bei der zunächst die in allen Wirten enthaltenen Bauteile miteinander verbunden werden. Ausgehend von dieser Stammverbindung kann dann im letzten Schritt die individuelle Seitengruppe jedes neuen Wirtmoleküls angebracht werden.

Zunächst wurde das literaturbekannte 3, 5-Diaminopyrazol<sup>[129-130]</sup> mit Trifluoressigsäureanhydrid monoacetyliert (Abb. 56). Hierzu wurde das Pyrazol vorgelegt und innerhalb von 65 h mittels einer Spritzenpumpe das Anhydrid zugetropft. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Produkt in mäßigen Ausbeuten von dem doppelt substituierten Derivat abgetrennt werden. Es entsteht allerdings keine im Ringstickstoffatom trifluoracetylierte Verbindung (HSAB-Prinzip).

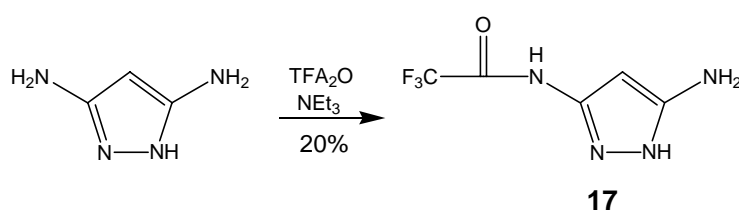


Abb. 56.: Darstellung von 3-Trifluoracetyl-amino-5-amino-*H*-pyrazol.

Aufgrund der Erfahrungen mit den dimeren Pyrazolen (vgl. 2.3.) wurde zunächst versuchsweise analog zu **4** ebenfalls mit der Boc-Gruppe im Ring zu schützen (Abb. 57).

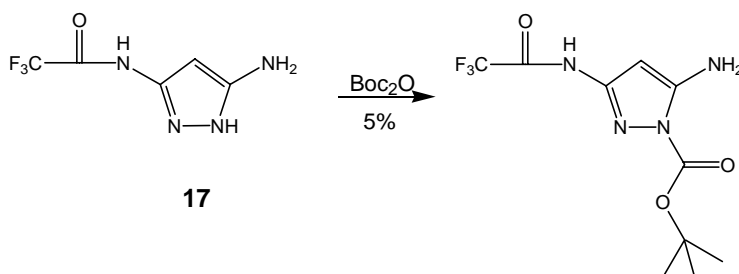


Abb. 57.: Darstellung von *N*<sub>1</sub>-Boc-geschütztem **17**.

Die Synthese lieferte jedoch ein schwer zu reinigendes Gemisch, wobei das gewünschte Produkt nur in schlechten Ausbeuten lediglich NMR und MS-sauber erhalten werden konnte.

Der Versuch, das Diaminopyrazol zunächst im Ring zu schützen und dann zu monoacetylieren, führte ebenfalls nicht zum gewünschten Erfolg ( Abb 58) .

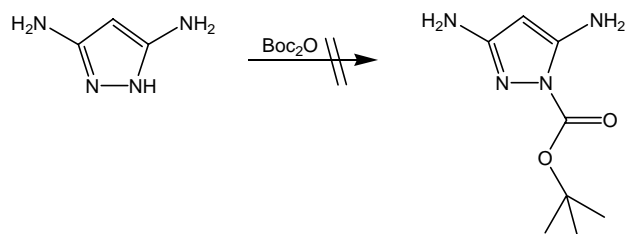


Abb. 58.: Versuch der Darstellung von  $N_1$ -Boc-geschütztem Diaminopyrazol.

Also wurde versucht, **17** direkt mit der Kemp' schen Trisäure zu verknüpfen. Dazu wurde zunächst das Verfahren über das Säurechloridanhydrid<sup>[ 131-133]</sup>angewendet, bei dem die beiden Komponenten in getrocknetem Pyridin erhitzt werden ( Abb. 59) .

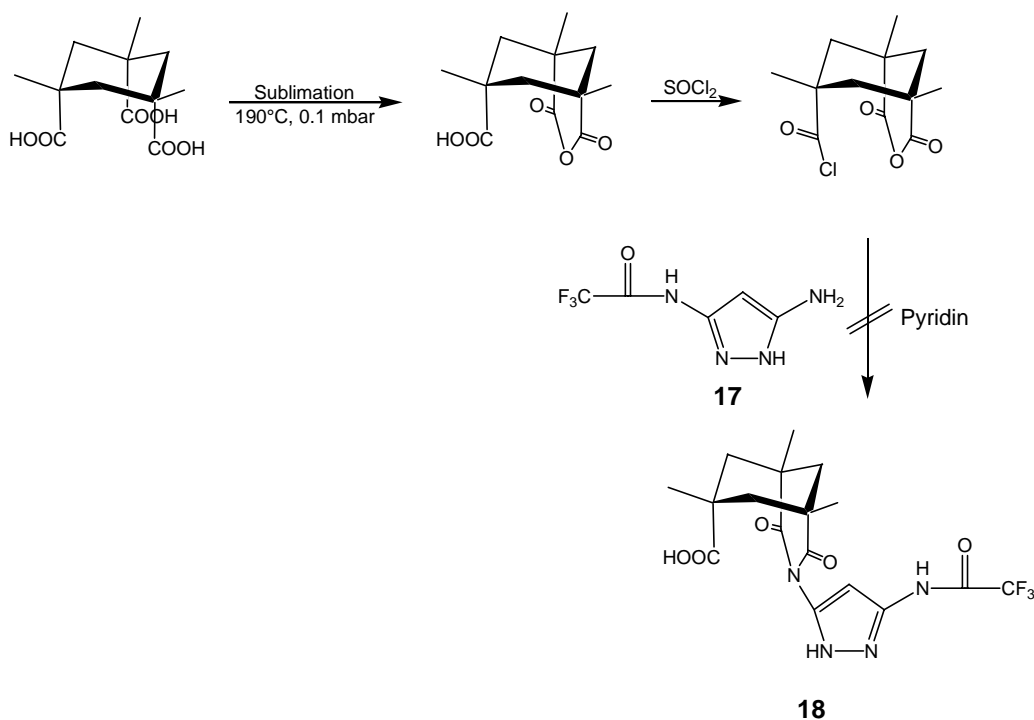


Abb. 59.: Versuchte Kupplung des Aminopyrazols an die Kemp' sche Trisäure über ihr Säurechloridanhydrid.

Dieser Versuch schlug jedoch fehl. Wahrscheinlich hat dabei lediglich das Säurechlorid mit der primären Aminogruppe von **17** zum Amid reagiert, während das Anhydrid entgegen der Literaturbeschreibung, sich nicht öffnete und deshalb auch nicht intramolekular zum Imid

weiter reagierte. Das bei der anschließenden säulenchromatographischen Aufreinigung hydrolysierte Anhydrid wird nicht eluiert, so daß auch das Amid nicht erhalten werden kann.

Die Synthese gelang schließlich über das einfache Anhydrid der Kemp'schen Trisäure,<sup>[112]</sup> welches mit **17** unter Wasserentziehenden Bedingungen das gewünschte Imid **18** bildete. Dazu wurden Anhydrid und **17** in Toluol am Wasserabscheider unter Rückfluß erhitzt, mit katalytischen Mengen Triethylamin. (Abb. 60). Das Produkt fiel analysenrein in sehr guten Ausbeuten aus der Reaktionslösung aus.

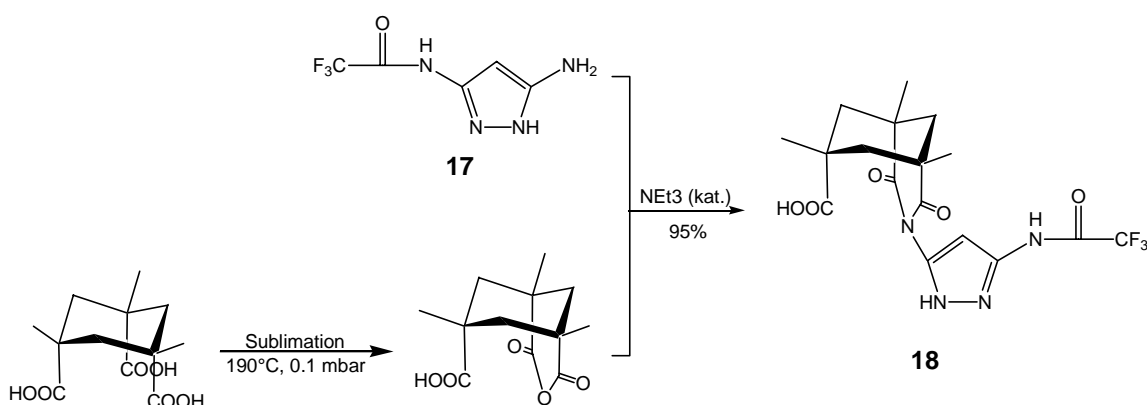


Abb. 60.: Darstellung des Grundbaustein**18**.

Die direkte Umsetzung von **18** mit *meta*-Aminoacetophenon und PyCloP<sup>[134-135]</sup>, einen Standardreagenz für Amidknüpfungen, ergab ein schwer zu trennendes Reaktionsgemisch und lieferte das gewünschte Produkt in sehr schlechten Ausbeuten (Abb. 61). Wahrscheinlich hat, wie in 2.4.1. besprochen, das Carboxylat in **18** mit dem Ringstickstoff eines weiteren **18** reagiert.

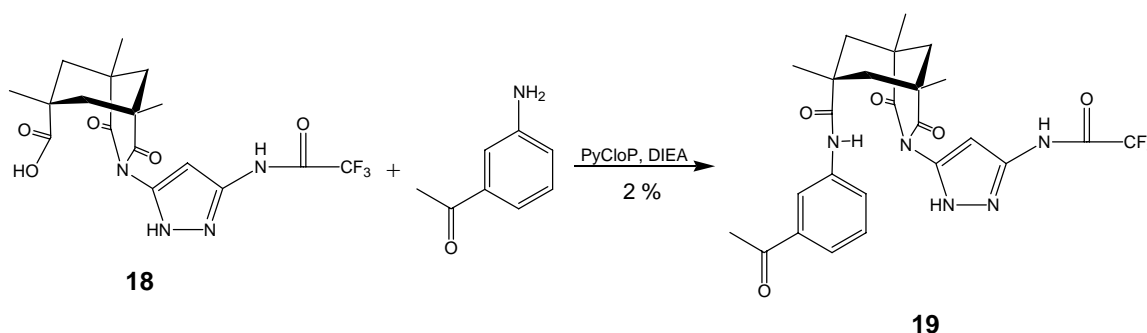


Abb. 61.: Direkte Darstellung des Serinbinder**19** aus **18** und *meta*-Aminoacetophenon.

Zur Verbesserung der Ausbeuten wurde der Ringstickstoff des Pyrazols von **18** zunächst geschützt. Eine geeignete und ausreichend stabile Schutzgruppe<sup>[78]</sup> für diese Anwendung ist,

wie für die Darstellung von **4**, die Boc-Gruppe. Die Standardmethode zur Boc-Schützung versagte jedoch in diesem Fall.<sup>[136]</sup> Aus diesem Grunde wurde eine Variante<sup>[137]</sup> eingeführt: dabei wird das Edukt **18** in reinem  $\text{Boc}_2\text{O}$  gelöst und auf  $90^\circ\text{C}$  erhitzt (Abb. 62). Hierbei ist die Einhaltung der Ölbadtemperatur kritisch. Unter  $85^\circ\text{C}$  findet nämlich keine Reaktion statt und über  $95^\circ\text{C}$  wird die Schutzgruppe thermisch wieder abgespalten.

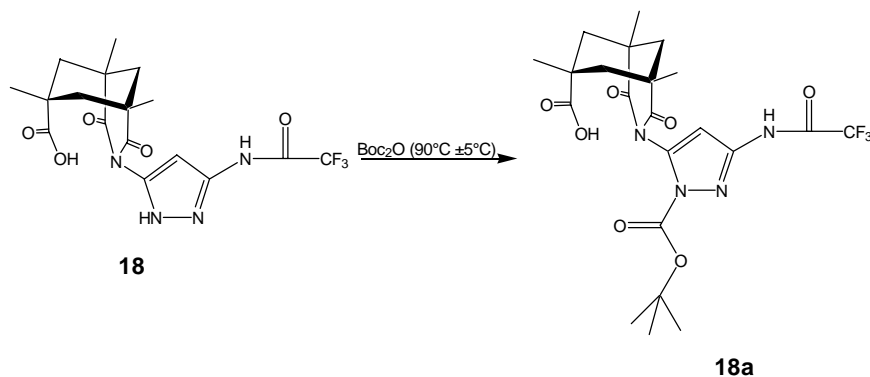


Abb. 62.: Darstellung von  $\text{N}_1$ -Boc-geschütztem **18a**

Bedingt durch die Instabilität von **18a** wurde die Reaktion lediglich dünnschichtchromatographisch kontrolliert und nach Verschwinden des Edukts das überschüssige  $\text{Boc}_2\text{O}$  mit einem Wasserbad abkondensiert. Für die folgende Amidierung wurde **18a** deshalb ohne weitere Reinigung eingesetzt. Dazu wurden mehrere Standardmethoden getestet:

Bei der Amidknüpfung über das gemischte Anhydrid aus diversen Chlorameisensäurealkylestern<sup>[138-139]</sup> und **18a** gefolgt von der Umsetzung mit einem Anilinderivat, wurde lediglich das entsprechende Urethan erhalten. Durch die räumlich anspruchsvolle Umgebung in **18** wird nach der Bildung des Anhydrids wahrscheinlich die Annäherung des Nucleophils an den inneren Carbonyl-Kohlenstoff behindert. So führte auch die Verwendung des sterisch anspruchsvollen Chlorameisensäureisobutylesters, der normalerweise die Bildung des Urethans unterdrückt, nicht zum Erfolg. Die sterische Abschirmung des gemischten Anhydrids von **18** als Ameisensäuremethylester zeigt die berechnete Struktur in Abb. 63.



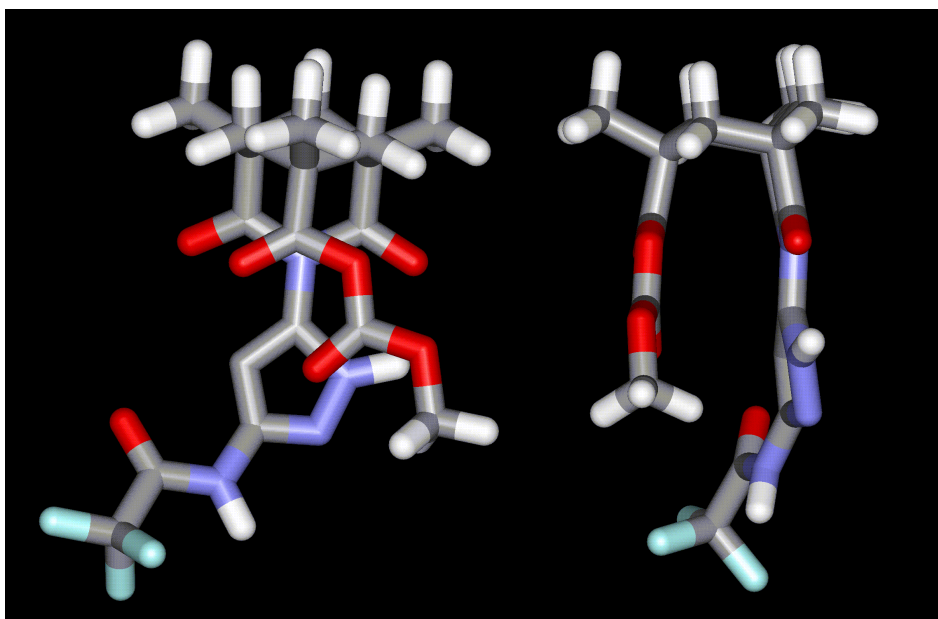


Abb. 63: Kraftfeldrechnung von **18**; beachte: die U-förmige Struktur mit der sterischen Abschirmung der Trajektorie verhindert den Angriff des Nucleophils an der Carboxylgruppe der Kemp'schen Trisäure (MM, OPLS-AA).

Die Verwendung von DCC<sup>[141-142]</sup> welches ebenfalls mit einer Standardmethode in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (abs.) eingesetzt wurde, ergab wieder nicht das gewünschte Molekül. Bei Erhitzen der Reaktionslösung zum Rückfluß konnte eine "Umimidierung" beobachtet werden (Abb. 64). Das entsprechende neue Imid wurde jedoch nur in Spuren NMR- und MS-sauber erhalten.

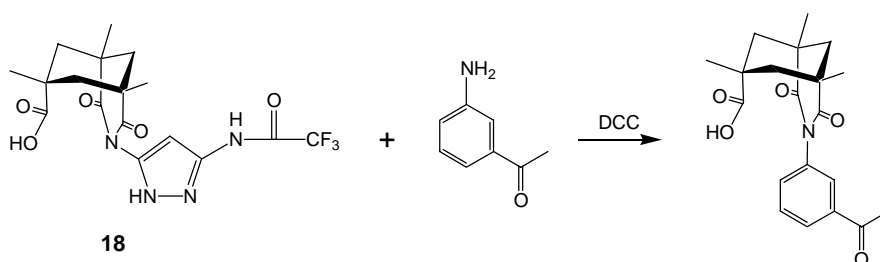


Abb. 64: Umimidierung von **18** mit meta-Aminoacetophenon und DCC

Schließlich wurde das bekannte Amidknüpfungsreagenz PyCloP<sup>[134-135]</sup> eingesetzt. Jedoch muß für eine erfolgreiche Amidknüpfung im Unterschied zu den Literaturbedingungen die Reaktion bei 50° C durchgeführt werden. Auch hier muß, wie bei der Darstellung von **18a** ein enger Temperaturbereich eingehalten werden. Unter 40° C findet keine Reaktion statt. Erhitzen zum Rückfluß führt zu einer Vielzahl von Nebenprodukten, aber nicht zur gewünschten Zielverbindung.

Die Problematik bei der Synthese der Dimere ( vgl. 2.3) , bestand darin, daß schon das leicht saure Kieselgel die Boc-Gruppe am Pyrazol wieder milde abspalten kann. Diese Tatsache wurde nun genutzt, um nach erfolgter Amidknüpfung bei der säulenchromatographischen Aufreinigung mittels einer Gradientensäule gleichzeitig das Pyrazol auf dem Kieselgel zu entschützen. So kann ausgehend von **18** in einer Eintopfreaktion jedes Amin an die dritte, freie Carbonsäurefunktion der Kemp' schen Trisäure gebunden werden. Dabei findet das Schützen, die Kupplung und das Entschützen ohne weitere Isolierung der Zwischenprodukte statt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden vier neue Wirtmoleküle synthetisiert, wobei drei durch Umsetzung von käuflichen oder leicht zugänglichen Aminen mit **18a** direkt zugänglich waren ( Abb. 65) .

Als *meta*-Anilinderivate werden *meta*-Aminoacetophenon, 3-Nitroanilin und 3-Ethylanilin<sup>[143-144]</sup> eingesetzt ( vgl. 2.4.2) .

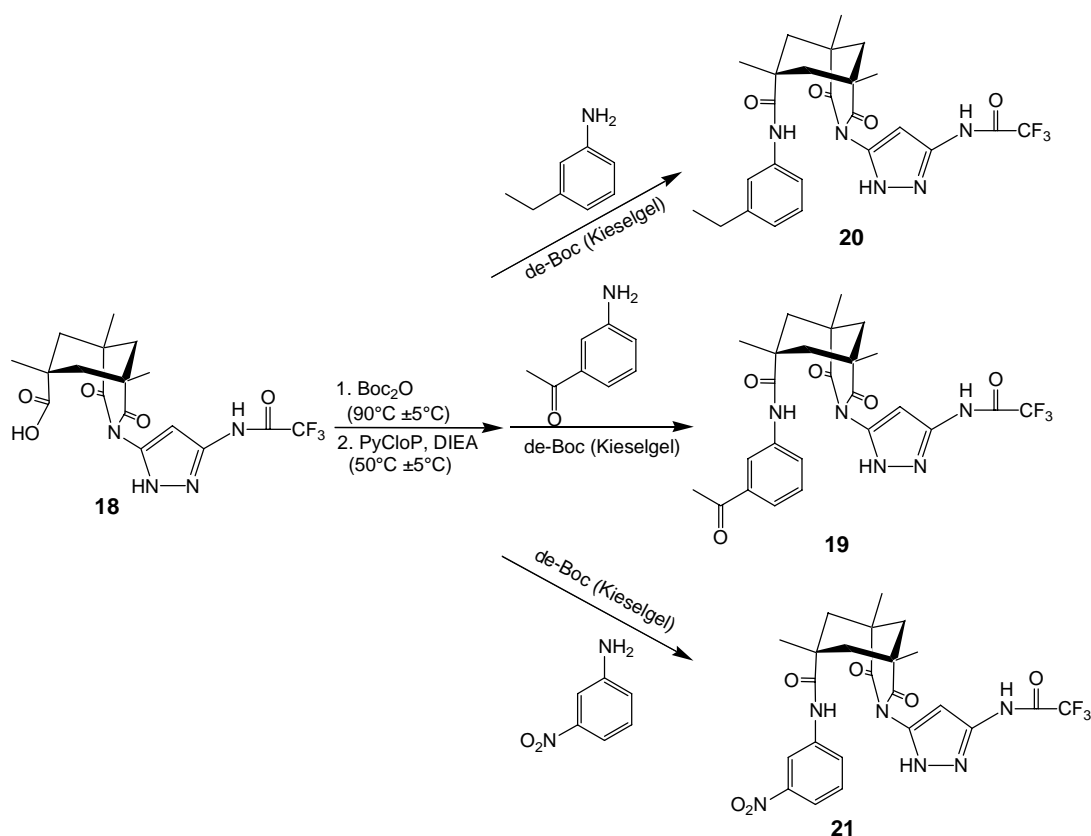


Abb. 65.: Darstellung von **19**, **20** und **21** mit den entsprechenden Anilinderivaten.

So erhält man einige der ersten Derivate der Kemp' schen Trisäure, bei denen sich zwei aromatische Systeme sehr nahe nebeneinander befinden. Das Pyrazol und der aromatische Seitenarm sind so ausgerichtet, daß sich die van-der-Waals-Radien annähernd berühren.

Durch Molecular-Modelling kann ebenfalls gezeigt werden, daß in der energiegunstigen Konformation die Bindungsstellen des Pyrazols und des Substituenten der Seitengruppe annähernd in einer Ebene liegen und somit für die Peptiderkennung ideal vororientiert sind ( Abb. 66) .

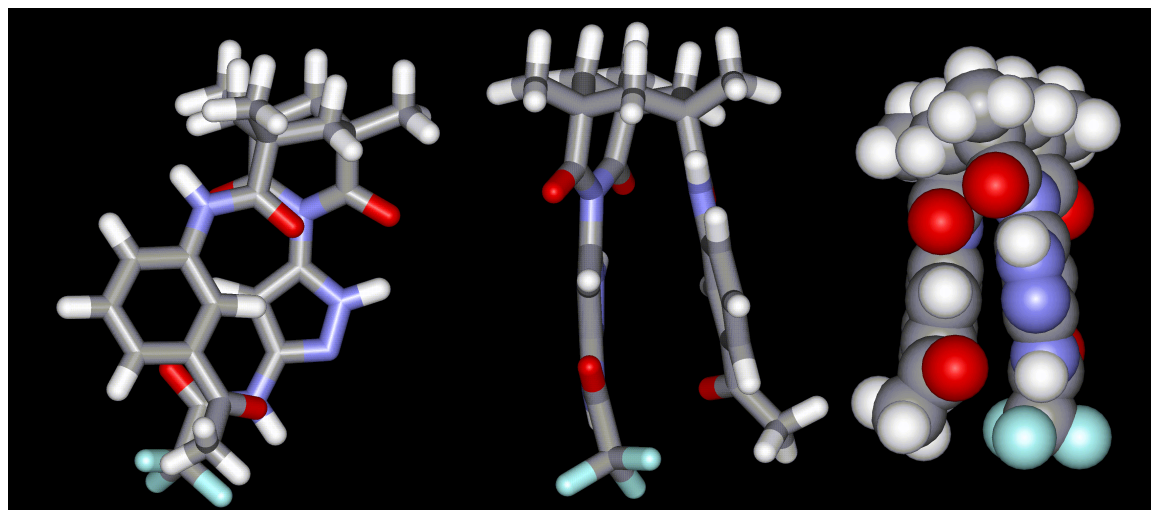


Abb. 66.: Kraftfeldberechnung von **19**, von links nach rechts: Zylinderdarstellung von der Seite; von vorne; von vorne mit berechneten van-der-Waals-Radien ( MM, Amber<sup>\*</sup>)

In der Synthese des ionischen Wirtes wird *meta*-Aminobenzoesäurebenzylester<sup>[ 145-146]</sup> über die PyCloP-Methode an **18a** gebunden. Anschließend wird die Schutzgruppe mit Wasserstoff über Palladium auf Kohle abhydriert.<sup>[ 147-148]</sup> Die entstandene freie Säure **22** wird mit äquimolaren Mengen Tetrabutylammoniumhydroxid in das Salz überführt, welches gleichzeitig den fertigen Rezeptor **23** darstellt ( Abb. 67) .

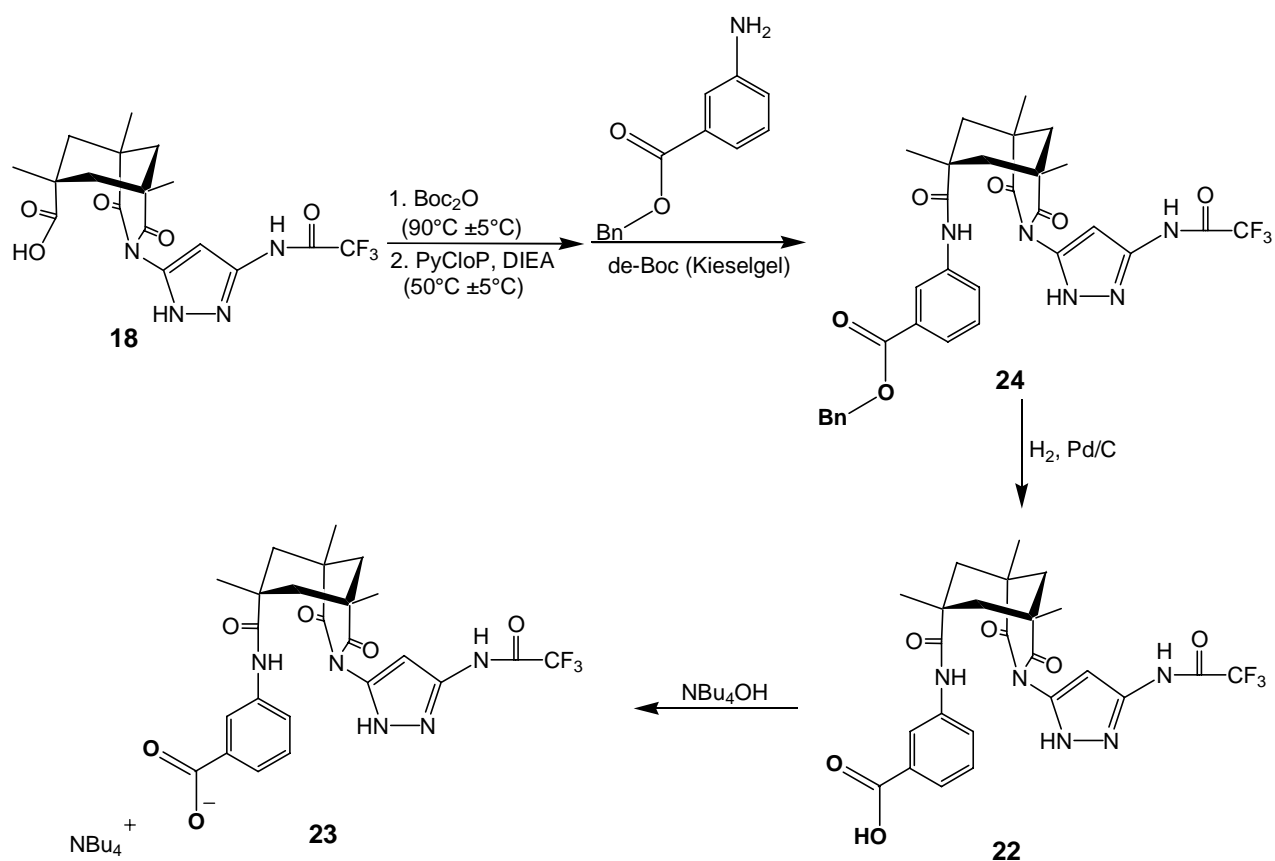


Abb. 67: Darstellung von **23**: **18a** wird zusammen mit *meta*-Aminobenzoesäurebenzylester und  $\text{PyClOP}$  zu **24** gekuppelt; Abhydrieren der Schutzgruppe mit  $\text{H}_2$   $\text{Pd-C}$  führt zur freien Säure **22**, die mit  $\text{NBu}_4\text{OH}$  in das entsprechende Salz **23** überführt wird

Im gewählten Tetrabutylammoniumion wird die positive Ladung durch die lipophilen Alkylketten abgeschirmt. Ähnlich einem Phasentransferkatalysator wird dadurch das vorliegende Salz **23** in annähernd jedem Lösungsmittel löslich.

## 2.5.4 Untersuchung der Wirtverbindungen über NOE-Experimente

Um einen genaueren Hinweis auf die Struktur der Wirtverbindungen zu erhalten, wurde der intramolekulare Kern-Overhauser Effekt (NOE) untersucht. Bei dieser NMR-Messmethode wird die Magnetisierung einzelner Kerne durch den Raum hindurch auf benachbarte Kerne übertragen. Voraussetzung dafür ist, daß der räumliche Abstand der Kerne klein ist, weil die für die longitudinale Relaxation verantwortliche Dipol-Dipol-Wechselwirkung proportional zum Abstand der Kerne ist. Normalerweise sieht man Effekte bis zu einer maximalen Entfernung von 5 Å. Doch auch wenn zwei Kerne diesen Abstand unterschreiten, kann der NOE durch Relaxationsmechanismen gelöscht werden.

Liegt ein Molekül im Gleichgewicht zwischen mehreren Konformationen vor, kann oft mit den beobachteten NOE-Kreuzsignalen eine Aussage über den hauptsächlich populierte Zustand gemacht werden.<sup>[149-151]</sup>

Bei der Untersuchung von **19** sollten NOE's von den Protonen des Anilinderivats zu dem der Pyrazolgruppierung zu erkennen sein. Um eine Überlagerung der Aromatensignale durch das Lösungsmittel zu verhindern, wird statt CDCl<sub>3</sub> als Lösungsmittel CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verwendet. Um das in diesem Lösungsmittel mäßig lösliche **19** für dieses Experiment in ausreichender Konzentration zu lösen, wird zusätzlich das polare und aprotische Acetonitril-d<sub>3</sub> verwendet (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / CD<sub>3</sub>CN 2: 1).

Im Experiment wurden einige intramolekulare Kreuzsignale gefunden, die in der Lewisstruktur in Abb. 83 verdeutlicht werden.

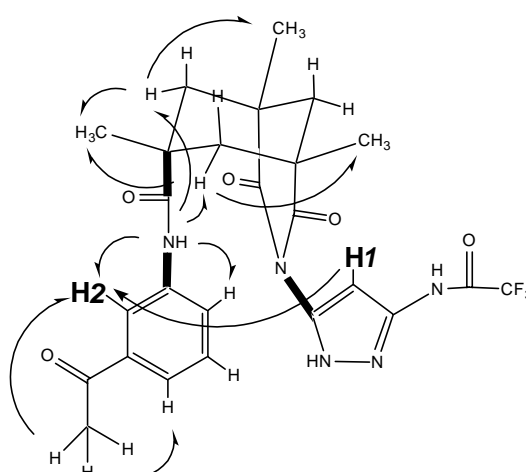


Abb. 83.: intramolekulare NOE's in **19**, besonders hervorzuheben ist das Kreuzsignal zwischen H<sup>1</sup> und H<sup>2</sup>, da keine weiteren Kreuzsignale zwischen den beiden aromatischen Gruppen auftreten, kann auf eine bestimmte Vorzugskonformationen im Wirt geschlossen werden.

Die Signale der beiden N-H-Protonen im Pyrazol sind in den gemessenen Spektren stark verbreitert und können deshalb keine Reflexe zeigen. Somit ist die einzige „Sonde“ für ein NOE-Kreuzsignal das H<sub>I</sub> vom Pyrazol zum benachbarten Seitenarm. Dieses zeigt lediglich das in Abb. 83 gezeigte eine Kreuzsignal zu H<sub>2</sub>.

Um dieses Kreuzsignal für die Bestimmung des hauptsächlich vorliegenden Konformers zu nutzen, wurden mit dem Programm MacroModel verschiedene Konformere energieminiert. Dabei wurde jeweils um eine der in Abb. 83 fett gedruckten Bindungen gedreht.

Von den so erhaltenen Strukturen liegen zwei tiefer als alle andere, bei denen H<sub>I</sub> und H<sub>2</sub> ähnlich weit voneinander entfernt sind ( 3.2 Å ). Die übrigen Protonen des aromatischen Seitenarms sind über 5 Å von H<sub>I</sub> entfernt. Diese zeigen keine NOE-Effekte, wie es die berechneten Strukturen ebenfalls vermuten lassen.

Die beiden Konformere gehen ineinander über, wenn um die C-N-Bindung zum Aromaten des Seitenarms gedreht wird. Eines der Rotamere ist für eine Peptidbindung geeignet, das andere nicht ( Abb. 84 ). Nur wenn alle Pyrazolstickstoffatome in dieselbe Richtung zeigen wie der Carbonylsauerstoff des *meta*-Aminoacetophenons ( Abb. 84, links) können sich vier Wasserstoffbrücken zum Peptid bilden ( vgl. Abb. 68 ). Nach der Drehung um die C-N-Bindung ragt die Bindungsstelle des Acetophenons in die entgegengesetzte Raumrichtung ( Abb. 84, rechts ). In dieser Konformation kann das zu erkennende Dipeptid nur über eine Dreipunkthaftung gebunden werden.

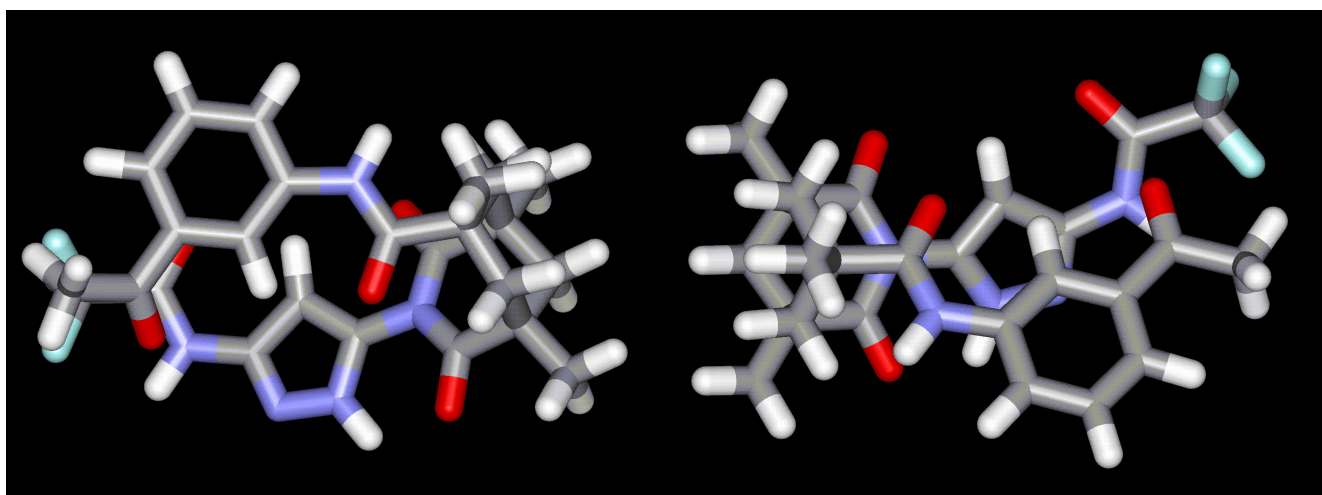


Abb. 84.: Beide Rotamere von **19**, erhalten durch Drehung um die C-N-Bindung im Acetophenonseitenarm der Wirtverbindung. Bei beiden Rotameren liegt das C-H-Proton im Pyrazol H<sub>I</sub> nahe genug am C-H-Proton zwischen den funktionellen Gruppen im *m*-Aminoactophenon H<sub>2</sub>, um einen NOE zu zeigen. Die anderen Protonen des Anilinderivats sind in beiden Konformeren zu weit von H<sub>I</sub> entfernt, um ein Kreuzsignal zu zeigen ( MM, Ambør<sup>\*</sup>

Welches der beiden in Abb. 84 gezeigten Konformere in Lösung vorliegt, kann nicht geklärt werden. Der berechnete Energieunterschied zwischen den beiden Zuständen beträgt  $1\text{ kJ / mol}$ ; da im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nur ein einziger Signalsatz zu erkennen ist, gehen wahrscheinlich beide Konformere bei Raumtemperatur schnell ineinander über.

Wenn beide Rotamere vorliegen, so muß bei der Komplexierung eines Dipeptids der **W19** im Sinne eines „induced fit“ zunächst in das „richtige“ Rotamer überführt werden, welches zu einer Bindung fähig ist.

Es liegt also eine Verbindung vor, die für eine Komplexierung in eine etwas energiereichere Konformation übergehen mußte. Diese Energiedifferenz zum Grundzustand schwächt den resultierenden Komplex.

## 2.6. Untersuchung des Komplexierungsverhaltens der neuen Wirte

### 2.6.1. Voruntersuchungen

Alle in diesem Kapitel vorgestellten NMR-Titrationen wurden in Chloroform durchgeführt. Bevor die neuen Wirtverbindungen untersucht wurden, sollte zunächst überprüft werden, welche Strukturellen Variationen des bekannten Systems von *Kirsten* möglich sind, ohne die molekulare Erkennung zu verlieren. Dazu wurde zunächst das bekannte Dipeptid Ac-Val-Val-OMe **1**<sup>[152]</sup> am *N*-Terminus verändert und die Acetylgruppe gegen eine Boc-Gruppe ausgetauscht. Bei der Titration von **2** mit Boc-Val-Val-OMe **25** (Abb. 67) konnte kein CIS beobachtet werden. Dies kann entweder durch den höheren sterischen Anspruch der tert-Butylgruppe oder die schwächere Polarisierung an der  $-C=O$ -Gruppe des Carbamats erklärt werden. Letzteres hätte eine schwächere Wasserstoffbrücke zwischen dem  $-N-H$  der Amidgruppe von **2** und dem Sauerstoff zur Folge. Beides führt zu einer Schwächung der Bindung und könnte zum Verlust der Komplexierung beitragen. Das literaturbekannte **2** verliert schon seine Affinität zu Dipeptiden, wenn sich in den Gastmolekülen eine N-terminale Boc-Gruppe befindet.

Wie zu erwarten konnte auch kein CIS zwischen **25**@**19** beobachtet werden. Im Gegensatz zum Komplex **2**@**1**, der eine Bindungskonstante von  $890\text{ M}^{-1}$  besitzt, konnte bei der NMR-Titration von **19**@**1** kein CIS beobachtet werden (Abb. 67).

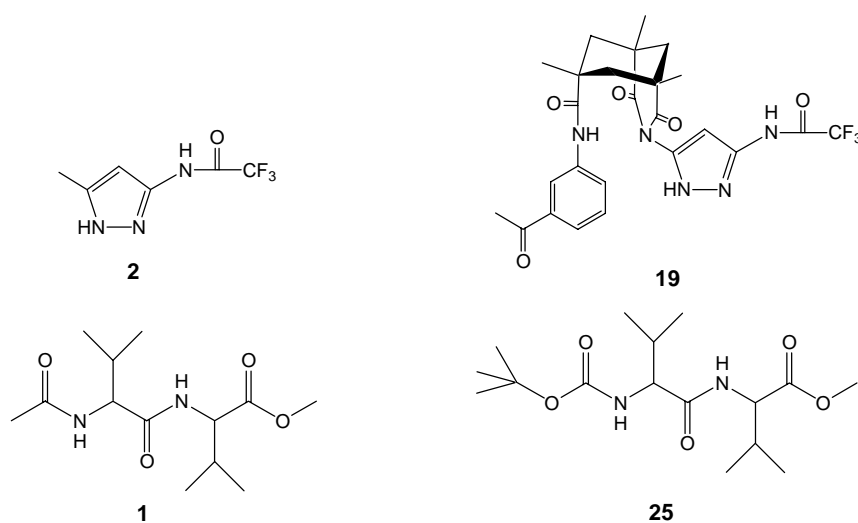


Abb. 67.: Voruntersuchungen **2**@**25** zeigt keinen CIS wegen des sterischen Anspruchs der Boc-Gruppe, **19** bindet an keines der beiden Dipeptide.



Dies läßt den Schluß zu, daß für eine Bindung **19** nicht nur die auch für **2** problematische Boc-Gruppe störend ist. Der große räumliche Anspruch der Isopropylgruppen der Valinreste verhindert wahrscheinlich eine Bindung an den sperrigen Wirt **19**. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein anderes Dipeptid gewählt, welches aus Aminosäuren mit kleineren Seitengruppen besteht. Hierzu bietet sich Alanin an, welches sterisch weniger anspruchsvolle Methylgruppen trägt. Das Dipeptid Ac-Ala-Ala-OMe **26** ist konformell viel weniger im  $\beta$ -Faltblatt vororientiert und sollte deshalb schlechter an **2** binden (vgl. 2.1.). Eine NMR-Titration von **26**@**2** ergab eine Assoziationskonstante von  $50 \text{ M}^{-1}$ . Das zeigt zwar, daß das Bindungsmuster des Pyrazols für eine Bindung ausreicht, durch die schlechte Vororientierung von **26** ist die entsprechende Assoziationskonstante aber deutlich geringer als die von **2**@**1**.

Weil im Rahmen dieser Doktorarbeit mehrere Dipeptide an den neuen Wirtverbindungen getestet werden sollen, ist es notwendig herauszufinden, welche Substituenten an den Aminosäuren von dem Pyrazolbindungsmuster noch toleriert werden. Deshalb wurde **2** mit Ac-Phe-Ala-OMe **27** titriert, welches eine Bindungskonstante von  $40 \text{ M}^{-1}$  ergab (Abb. 68).

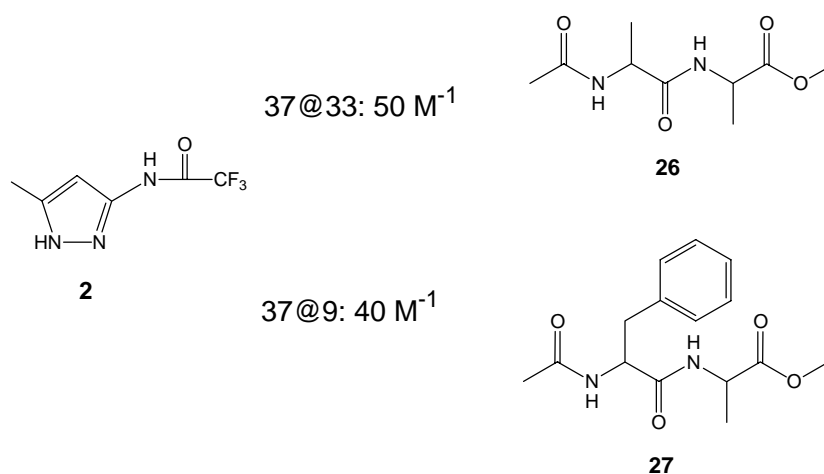


Abb. 68.: Ergebnis der Bindungsstudien von **2** mit unterschiedlichen Dipeptiden.

Mit dem Wissen, daß **2** eine Bindung auch zu dem schlecht vororientierten, räumlich kleineren **26** eingeht, wurde die Stabilität von Komplex **19**@**26** untersucht, die NMR-Titration ergab eine Bindungskonstante  $80 \text{ M}^{-1}$ . Eine weitere Titration von **20**@**26** ergab eine sehr ähnliche Assoziationskonstante von  $70 \text{ M}^{-1}$  und zeigte einen 1:1-Komplex. Also sind die angenommen Komplexgeometrien wahrscheinlich korrekt.

Die Bindung des acylierten Aminopyrazols an ein Peptidrückgrat beruht auf der Erkennung eines Dipeptids. In Abschnitt 2.4.1 wurde erarbeitet, welche Aminosäure selektiv erkannt werden sollen. Für die Ausbildung der drei Wasserstoffbrücken zum Aminopyrazolbindungs-

muster wird eine zweite Aminosäure benötigt. Aufgrund der in diesem Abschnitt erarbeiteten Ergebnisse wird dies Alanin sein.

Um eine Selbstassoziation der Wirtmoleküle auszuschließen, wurde **19** in einem Verdünnungsexperiment untersucht. Dazu wurden mehrere Proben in einem Konzentrationsbereich vermessen, wie er bei den NMR-Titrationsen vorlag. Es ergab sich lediglich ein Shift der Signale von 0.005 ppm. Es liegt also keine Selbstassoziation des Wirtes **19** vor.

## 2.6.2 Untersuchung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke im Komplex

Mit dem Wissen aus Kapitel 2.1. kann die Auswirkung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke auf die Bindungsstärke der Aminopyrazol-Peptid-Komplexe bestimmt werden. Dazu wurden zunächst Modellierungstudien von dem Komplex **19** mit Ac-Ser-Ala-OMe **28** durchgeführt ( Abb. 69) .

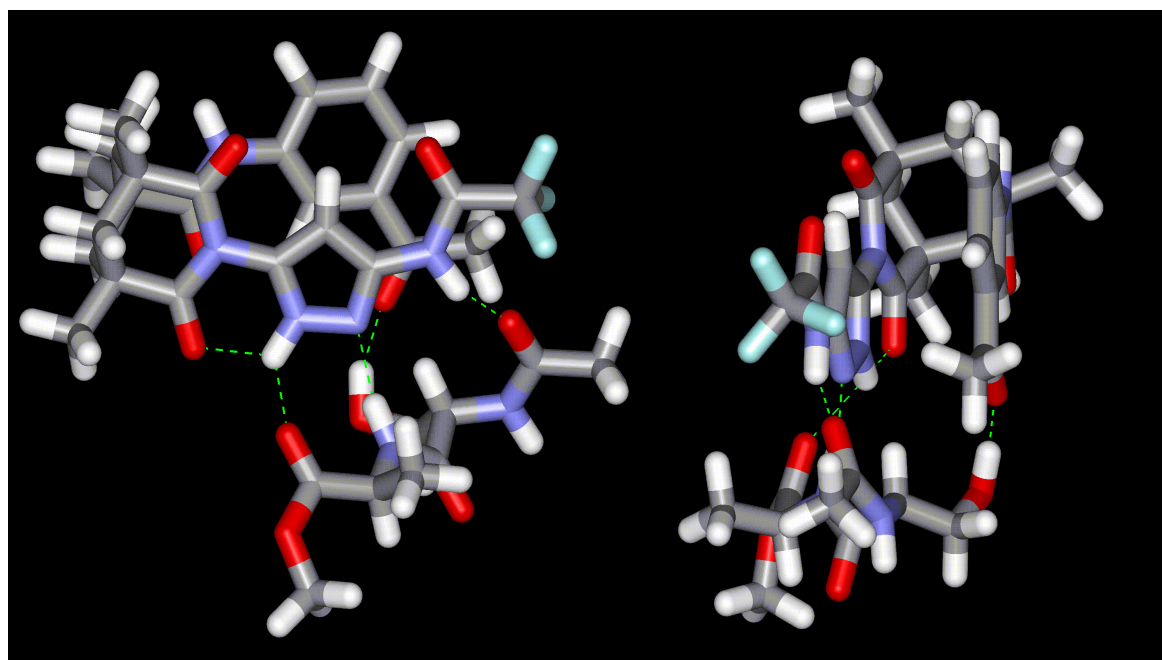


Abb. 69.: MolecularModelling von **19@28**; *links*: Seitenansicht; *rechts*: Frontansicht; man erkennt die Vororientierung des Pyrazols und der Seitenkette. Dadurch kann **19** vier intermolekulare Wasserstoffbrücken zum Dipeptid eingehen. *rechts*: Die H-Brücke zwischen dem – C=O des Acetophenons und dem Wasserstoff der OH-Gruppe des Ser ist zu erkennen. Durch die intermolekulare Wasserstoffbrücke vom Imid zum Pyrazol-Ring-N-H ( *links*) wird das zur Bindung benötigte Tautomer ( vgl. Abb. 19) zusätzlich stabilisiert ( MM, Amber<sup>\*</sup>

Im berechneten Komplex erkennt man die gute Vororientierung des Wirtes **19** um sowohl das bekannte Bindungsmuster des Peptidrückgrats mit dem Pyrazol einzugehen, als auch eine Wechselwirkung mit der Hydroxylgruppe des Serins. Um den Beitrag dieser zusätzlichen Wasserstoffbrücke zu bestimmen, wird Dialanin als Standard gewählt, welches diese Seitengruppe nicht trägt. Hierzu wurde zunächst der Komplex **19@26** untersucht, der eine Assoziationskonstante von  $80 \text{ M}^{-1}$  ergab. Die NMR-Titration von **19@28** dagegen lieferte eine Bindungskonstante von  $900 \text{ M}^{-1}$ , ist also 11-mal größer (Abb. 70). Ein Job-Plot Experiment zeigt, daß es sich um einen 1: 1-Komplex handelt.

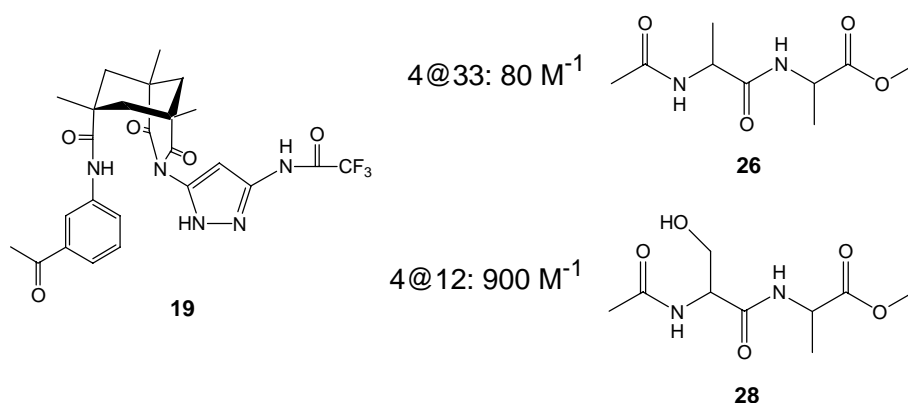


Abb. 70.: Bindungskonstanten von **19@26** und **19@28**, das Dipeptid mit der zusätzlichen Hydroxylgruppe wird 11mal stärker gebunden

Der Vergleich zwischen den beiden Versuchen zeigt, daß eine zusätzliche Wasserstoffbrücke die Bindungskonstante um eine Größenordnung erhöht.

Um die beobachtete Selektivität von der „anderen Seite“ zu bestimmen, wird die Bindungsstelle nicht am Gast- sondern am Wirtmolekül entfernt. Dies geschieht chemisch indem die Acetylgruppe von **19** durch einen Ethylsubstituenten in **20** ersetzt wird.

Die Untersuchung der Komplexstöchiometrie von **20@28** ergab allerdings, daß es sich um einen 2: 1-Komplex handelt (Abb. 71). Ein Vergleich der Bindungskonstanten von **19@28** und **20@28** ist auf Grund der unterschiedlichen Komplexgeometrien nicht zulässig.

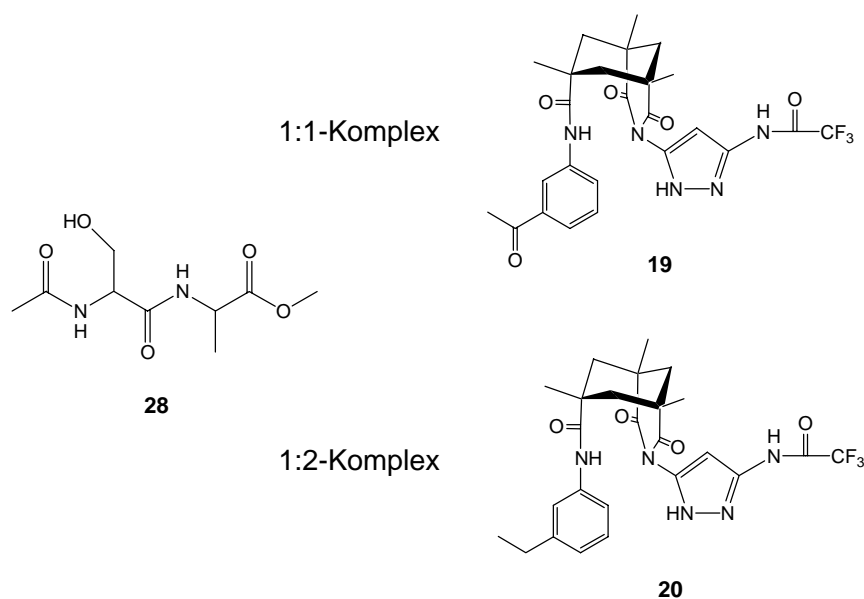


Abb. 71.: Komplexstöchiometrien der Komplexe **19@28** und **20@28**

In Kapitel 2.6.1 wurde nach der Untersuchung von **19@1** und **19@26** geschlossen, daß ein Dipeptid mit Valin nicht an **19** bindet. Es ist aber auch denkbar, daß lediglich das N-terminale Valin die Ausbildung eines Komplexes inhibiert, das C-terminale aber nicht. Um zu klären, ob **19** durch die Geometrie der Wirtverbindung, auch hinsichtlich der C-terminalen Aminosäure wählerisch ist, wird das Bindungsverhalten an einem weiteren Dipeptid untersucht. Dabei wird in **26** Alanin durch Valin ersetzt. Die NMR-Titration von Ac-Ser-Val-OMe **29@19** ergab jedoch keinen CIS. Auch die Bindungsstudie von Ac-Val-Ser-OMe **30@19** zeigte keine meßbaren Verschiebungen der NMR-Signale (Abb 72).

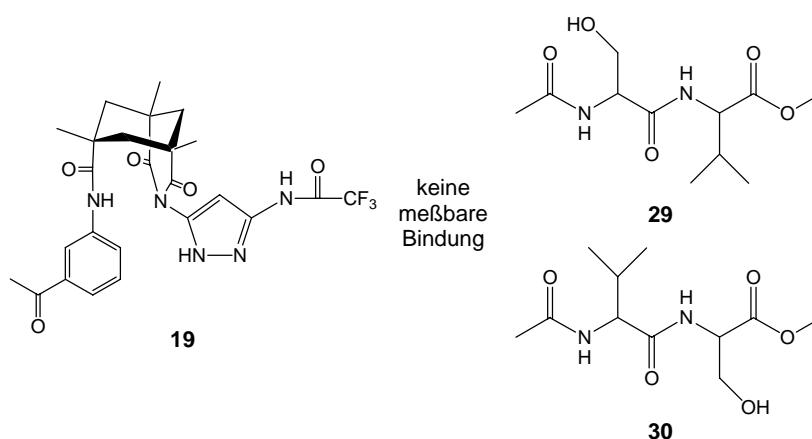


Abb. 72.: Bindungsstudie von **19@29** und **19@30**; durch den hohen sterischen Anspruch der Isopropylgruppen in den Dipeptiden wird eine Bindung verhindert.

Dieser Sachverhalt lässt sich durch den Vergleich der berechneten Strukturen der jeweiligen Komplexe verdeutlichen ( Abb. 73) .

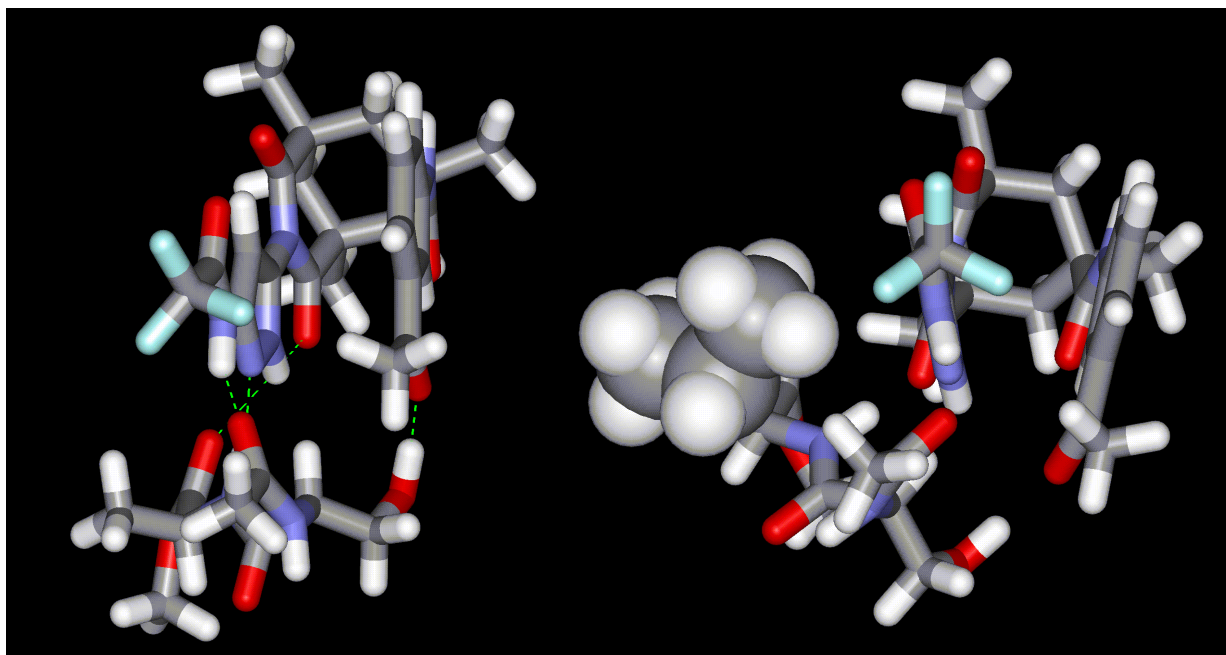


Abb. 73.: berechnete Komplexstrukturen von **19@28** und **19@29**; links: **19@28**; rechts: man erkennt, daß das Valin im Dipeptid durch seinen größeren sterischen Anspruch die Bindung an das Wirtsmolekül behindert; um die Größe der Isopropylgruppe zu verdeutlichen ist ihr van-der-Waals-Radius angegeben ( MM, Amber\*).

Durch die gewinkelte Lage des Dipeptids sind auch die Winkel der Wasserstoffbrückendonoren und – akzeptoren zueinander so ungünstig, daß diese vom Computer nicht als Wasserstoffbrücken erkannt werden ( vgl. Abb. 34) .

Aus diesem Grund wurden für die weiteren Untersuchungen nur Dipeptide hergestellt, welche Alanin enthalten.

Zusammenfassend kann formuliert werden, daß **19** nicht nur bevorzugt an ein *N*-terminales Serin bindet, sondern durch seinen hohen räumlichen Anspruch auch eine schlanke *C*-terminale Aminosäure im untersuchten Dipeptid fordert.

Es zeigt sich einmal mehr, daß eine gewisse Flexibilität im Wirtdesign für eine gute Bindung essentiell ist, denn eine konformationelle Änderung wie sie für den Komplex **19@28** nötig ist, kann eine völlig starre Verbindung nicht eingehen ( vgl. 2.5.4) .

### 2.6.3. Untersuchung einer zusätzlichen $\pi$ -Stapelung im Komplex

Wie schon in Kapitel 2.4.2 begründet, soll der Wir**21** eine spezifische Wechselwirkung mit der Seitenkette von Phenylalanin eingehen. Um dessen Selektivität zu bestimmen, sollten die untersuchten Wirte sterisch möglichst gleich anspruchsvoll sein, jedoch elektronisch unterschiedlich.<sup>[ 153-154]</sup> **21** und **20** erfüllen diese Bedingungen. **20** hat den entsprechenden räumlichen Anspruch von **21**, der +I-Effekt der Ethylgruppe erhöht jedoch die Elektronendichte in der aromatischen Seitengruppe. Im Gegensatz dazu erniedrigt die Nitrogruppe von **21** dessen aromatische Elektronendichte. So müssen im Komplex von **20** mit Ac-Phe-Ala-OMe **27** zwei elektronenreiche Aromaten eine  $\pi$ -Stapelung eingehen. Im entsprechenden Komplex **21**@**27** dagegen können ein elektronenarmer und ein – reicher Aromat in Wechselwirkung treten. Dies ist durch den Charge-transfer-Effekt günstig.

Elektrostatische Potentialoberflächen (EPS) von Aromaten, können durch Simulationsprogramme berechnet werden.<sup>[ 155]</sup> Um einen Eindruck von den EPS in den Seitenarmen von **20**, **21** und Phenylalanin zu bekommen, wurden diese berechnet. Zur Vereinfachung sind lediglich die Eigenschaften der Aromaten von Interesse, deshalb werden kleine Modelle von diesen für die Simulation herangezogen. Dafür sind für **21** N-Formyl-3-nitroanilin, für **20** N-Formyl-3-ethylanilin und für Phenylalanin Toluol geeignete Modellverbindungen. Die Formylsubstituenten simulieren die Amidbindung zur Kemp'schen Trisäure **20** und **21**, die jeweiligen *meta*-Substituenten werden beibehalten. In Toluol wird durch die Methylgruppe die CH<sub>2</sub>-Gruppe der Seitengruppe von Phe entsprechend ersetzt ( Abb. 74) . Bei den berechneten EPS ist zu erkennen, daß in den Modellen der berechneten Seitenarme für **20** und Phe ähnlich sind. N-Formyl-3-nitroanilin hingegen ist elektronenarm, somit geeignet, um eine Stapelung mit dem Seitenarm von Phenylalanin einzugehen.

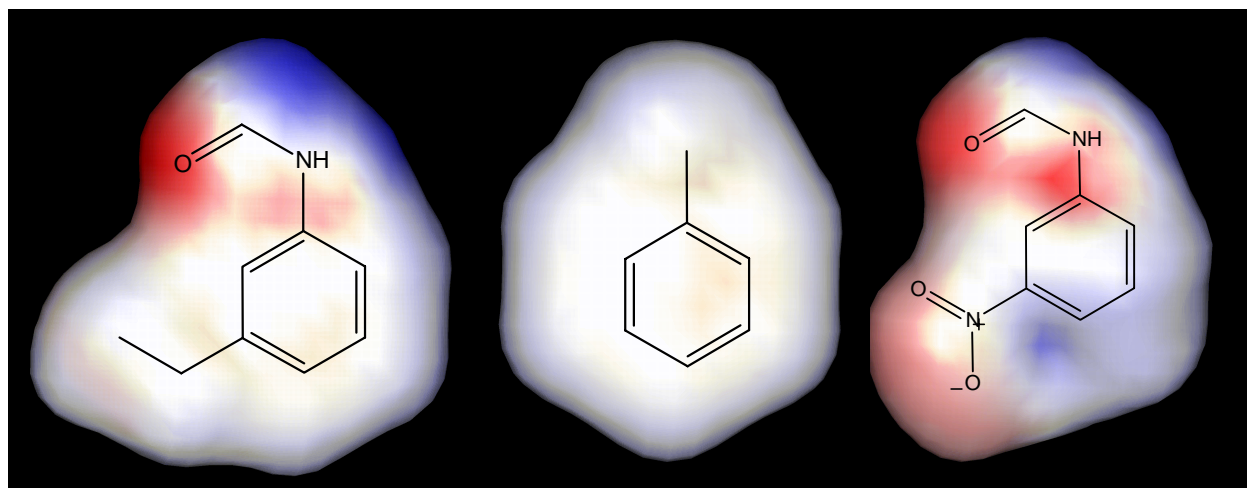


Abb. 74.: Berechnung des EPS der Modelle der Seitengruppen von **20**, **21** und Phe; rot: elektronenreich, blau: elektronenarm, gelb: mittlere Elektronendichte, links nach rechts: *N*-Formyl-3-ethylanilin ( a ), Toluol ( b ), *N*-Formyl-3-nitroanilin ( c ); gut zu erkennen ist das ähnliche EPS von a und b, wodurch eine Wechselwirkung energetisch ungünstig ist; c dagegen ist über dem Ring elektronenarm, wodurch eine  $\pi$ -Stapelung begünstigt wird ( MM, Ambö<sup>\*</sup>r).

Die Bindungsstudie von Ac-Phe-Ala-OMe **27** mit dem einfachen Trifluoracetylaminopyrazol **2** von Kapitel 2.6 gab mit  $40 \text{ M}^{-1}$  einen Hinweis auf die Assoziation zu **27** mit dem bekannten Bindungsmuster. Der Komplex von **27** mit dem Ethylaromat tragenden Wirt **20** hat eine bemerkenswert ähnliche Bindungsstärke von  $45 \text{ M}^{-1}$ . Dies ist ein Hinweis, daß die Komplexgeometrien von **27**@**20** und **27**@**2** ähnlich sind, wie es bei den Berechnungen auch angenommen wurde. Die Orientierung von Wirt und Gast für das Molecular-Modelling ist somit richtig.

Die NMR-Titration des Wirtes mit dem Nitroaromat **21**@**27** ergab eine Bindungskonstante von  $350 \text{ M}^{-1}$ . Es liegt also im Vergleich zu **20** eine 7, 5-fach stärkere Affinität zu dem untersuchten Dipeptid **27** vor ( Abb. 75) . Der Job-Plot von **21**@**27** zeigt, daß es sich um einen 1: 1-Komplex handelt.

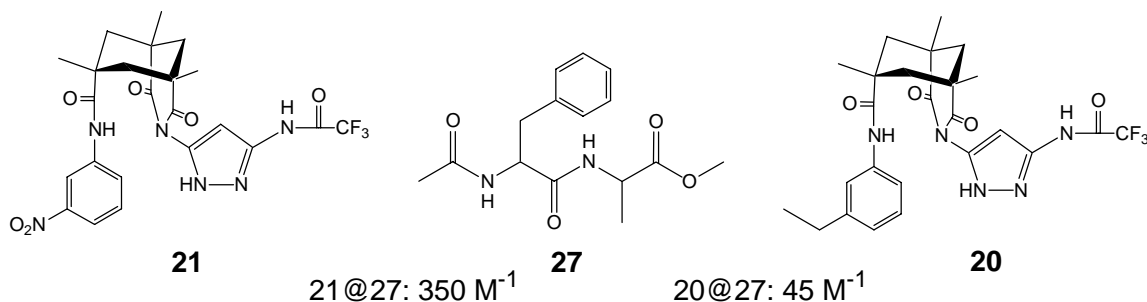


Abb. 75.: Bindungskonstanten von **21@27** und **20@27**. Bedingt durch die unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften der Seitengruppen liegt eine 7.5fach höhere Affinität von **21@27** im Vergleich zu **20@27** vor.

Die berechneten Komplexe verdeutlichen die unterschiedlichen Arten der Wechselwirkung der beiden Wirtmoleküle mit dem Dipeptid ( Abb. 76) . Im Komple**21@27** können die Aromaten, mit unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften von Wirt und Gast, ideal übereinander „ stapeln“ . Durch die repulsiven Kräfte in den Seitenarmen mit ähnlichen elektronischen Eigenschaften in **20@27**, können die Aromaten nur versetzt zueinander stehen. Dadurch ist die Bindungskonstante kleiner als in **21@27**.

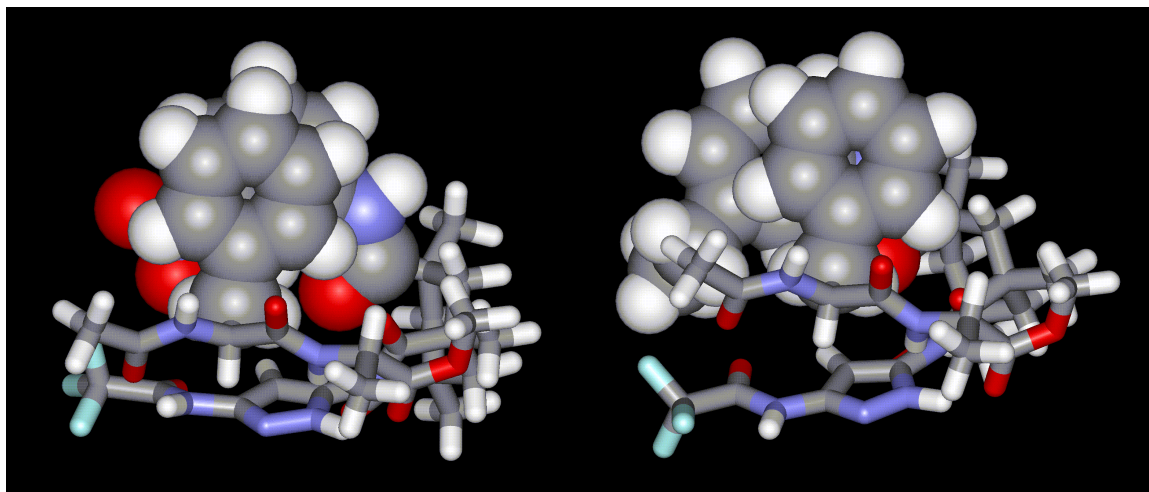


Abb. 76.: berechnete Komplexe von **21@27** ( links) und **20@27** ( rechts) ; zur Verdeutlichung sind die van-der-Waals-Radien der aromatischen Seitengruppen angegeben; *links*: die elektronisch unterschiedlichen Aromaten stapeln gut; *rechts*: der Phenylring von Phenylalanin und der Seitenarm von **20** stehen bedingt durch die energetisch ungünstige Wechselwirkung versetzt zueinander ( MM, Amber MC) .

In Kapitel 2.6.2 konnte gezeigt werden, daß **19** für beide Aminosäuren des Dipeptids selektiv ist, wobei diese jeweils einen definierten räumlichen Anspruch haben müssen. Zusätzlich soll



nun geklärt werden, ob die Reihenfolge der Aminosäuren auch für eine Bindung an **21** relevant ist. Dazu wurde eine NMR-Titration von Ac-Ala-Phe-OMe **31**@**21** durchgeführt, welche jedoch keine CIS zeigte (Abb. 77).

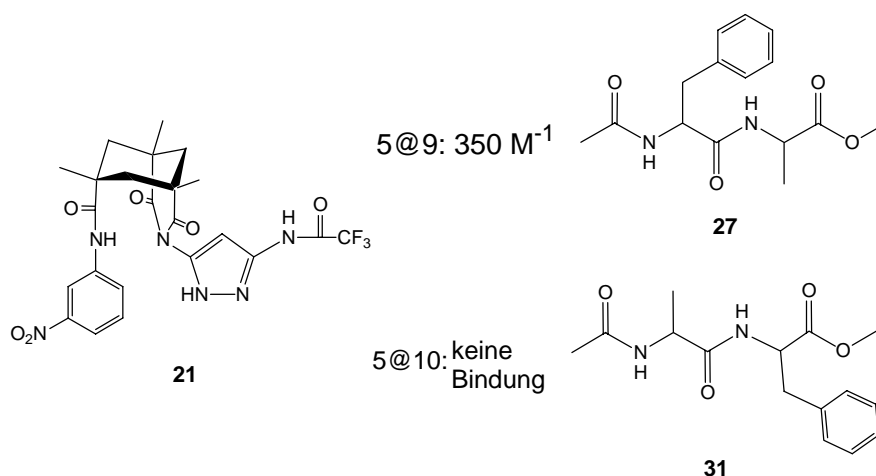


Abb. 77.: Bindungsstudie zwischen **21**@**27** und **21**@**31**; die Dipeptide unterscheiden sich in ihrer Sequenz; lediglich das Peptid mit der „richtigen“ Sequenz wird gebunden.

Durch die Berechnung der beiden Komplexe lässt sich dieser Sachverhalt erklären (Abb. 78). Im Komplex **21**@**27** können sich die aromatischen Seitenkette von Wirt und Gast für eine Wechselwirkung ideal vororientieren. Wird die Sequenz des Dipeptids umgekehrt, so ragt die aromatische Seitengruppe von **10** in die entgegengesetzte Raumrichtung der Erkennungsgruppe von **21**.

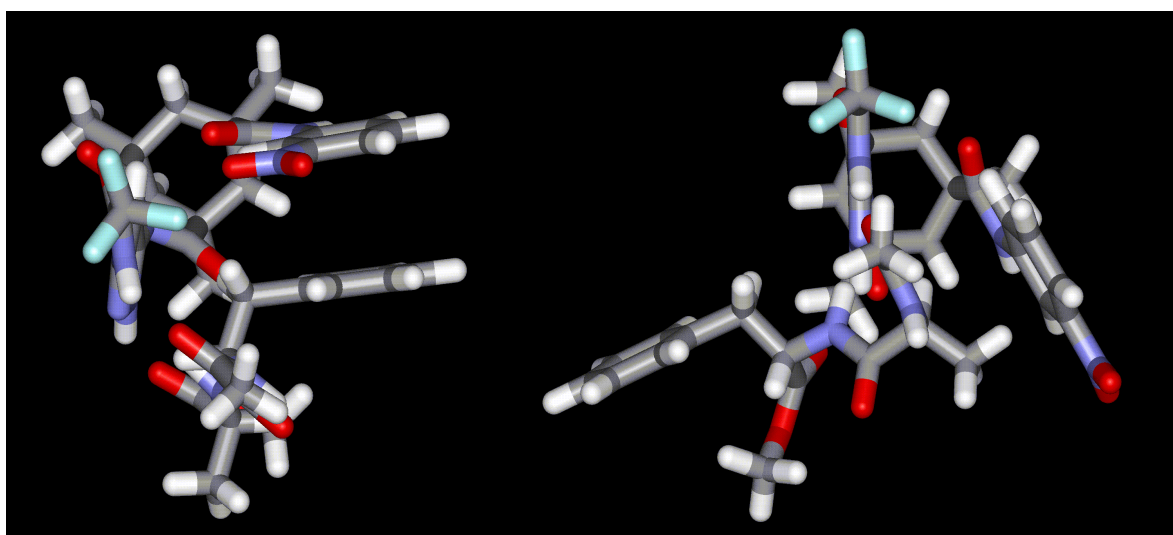


Abb. 78.: MolecularModelling von **21**@**27** (links) und **21**@**31** (rechts); bedingt durch die entgegengesetzten Richtungen, in die die aromatische Seitenarme von **27** und **31** gerichtet sind, kann nur der von **27** mit der Erkennungsgruppe von **21** wechselwirken (MM, Amber MC)

Der Rezeptor **21** besitzt also zusätzlich zur Selektivität für *N*-terminales Phenylalanin auch eine ausgeprägte Sequenzselektivität.

#### 2.6.4. Untersuchung einer zusätzlichen ionischen Bindung im Komplex

Eine ionische Wechselwirkung bringt in Chloroform einen wesentlich größeren Beitrag zur Komplexbildungsstärke als eine Wasserstoffbrücke. Für die Komplexierung muß allerdings die Salzbrücke zu den jeweiligen Gegenionen von Wirt und Gast getrennt werden. Erst dann können Wirt und Gast die eigentliche Wechselwirkung eingehen. In dem sich einstellenden Gleichgewicht müssen die neu gebildeten Komplexe stabiler sein als die Vorherigen. (Abb. 79).

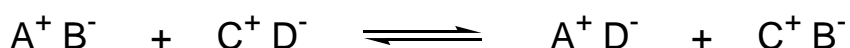


Abb. 79.: Ausbilden einer ionischen Wechselwirkung von Wirt A mit D<sup>-</sup>; zunächst müssen die Ionenpaare AB und CD getrennt werden, erst dann kann sich der Komplex von A<sup>+</sup> und D<sup>-</sup> bilden.

Durch die sperrigen lipophilen Alkylreste des Tetrabutylammoniumkations von **23** kann das entsprechende Salz mit dem Benzoat als lösungsmittelgetrenntes Ionenpar angesehen werden. Wie in 2.4.1 dargelegt, soll als zu erkennende Seitengruppe im Peptid das Amin von Ornithin verwendet werden. Dieses wird als Ammoniumkation mit einem Acetat-Gegenion eingesetzt, denn das Acetat ist dem Carboxylat der Benzoesäure von seiner elektronischen Struktur her ähnlich.

Eine Untersuchung der Selbstassoziation von **32** zeigte in einer Verdünnungstitration starke Hochfeldshifts der N-H-Signale. Dieser Shift beruht auf einer intermolekularen Komplexierung des beobachteten Protons durch das Acetatgegenion. Die bestimmte Selbstassoziationskonstante war jedoch kleiner 10 M<sup>-1</sup>. Eine so niedrige Selbstassoziation verfälscht die Ergebnisse der NMR-Titrationen mit den einzelnen Wirtverbindungen nicht. Deshalb wurde auf eine Korrektur der Bindungskonstanten verzichtet. Aufgrund der Signalshifts von **32** bei NMR-Titrationen werden für die Bestimmung der Komplexstöchiometrien von **23**@**32** die Signale des Wirtes **23** beobachtet, die im Job-Plot einen 1:1-Komplex zeigen.

Bei der NMR-Titration von Ac-Orn-Ala-OMeHOAc **32@23** belief sich die Komplexbildungskonstante auf  $2360 \text{ M}^{-1}$  (Abb. 80).

Es stellt sich auch bei diesem System die Frage nach einem geeigneten Standard zur Bestimmung der Selektivität der Bindung von **23** an **32**. Das Entfernen des Seitenarms von Orn, also Ac-Ala-Ala-OMe**26** als Maß für die isolierte Bindung an das Peptidrückgrat zu nehmen, ist bei diesem Wirt nicht zulässig. Das Carboxylatanion in **23** ist ein starker Wasserstoffbrücken-akzeptor könnte mit jedem N-H-Proton des Dipeptids eine Wechselwirkung eingehen, die stärker als das Bindungsmuster des Pyrazols wäre. Es würde also ein unspezifischer Komplex **23@26** an das Peptidrückgrat ausgebildet.

Denkbar ist es, die anionische Bindungsstelle am Wirt zu entfernen, also die Bindung von **20@32** zu untersuchen. Hierfür gelten nicht die gleichen Bedingungen, wie bei dem Komplex **23@26**. Zwar könnte das Ammoniumkation im Ornithin als Wasserstoffbrückendonator an jede partiell negativ geladenen Gruppe im Wirtmolekül binden. Die  $\text{NH}_3^+$ -Gruppe in **32** liegt aber nicht als annähernd freies Ion vor wie das Benzoat-Anion **23** der Fall ist, sondern als starkes Kontaktionenpaar mit dem Acetat. Das Ionenpaar Alkylammoniumkation-Acetatanion ist wesentlich stärker und würde in Chloroform kaum zugunsten einer Wechselwirkung der  $\text{NH}_3^+$ -Gruppe mit einem negativ polarisierten Substituenten dissoziieren. Die NMR-Titration von **20@32** ergab wie erwartet eine relativ niedrige Bindungskonstante von  $280 \text{ M}^{-1}$ .

Um zu beweisen, daß der Wirt **23** mit Ornithin nicht nur ein starkes Ionenpaar bildet, sondern zusätzlich auch das Rückgrat von **32** erkennt, wurde ein Gast verwendet, der nur zur Ionenbildung fähig ist. Hierzu wird n-Propylaminhydroacetat **33@23** titriert; die Stabilitätskonstante betrug  $390 \text{ M}^{-1}$ . Die Differenz zur wesentlich höheren Bindungskonstante desselben Wirtes **23** mit dem Ornithinhaltigen Dipeptid muß aus der Erkennung des Peptidrückgrats durch das Aminopyrazol kommen.

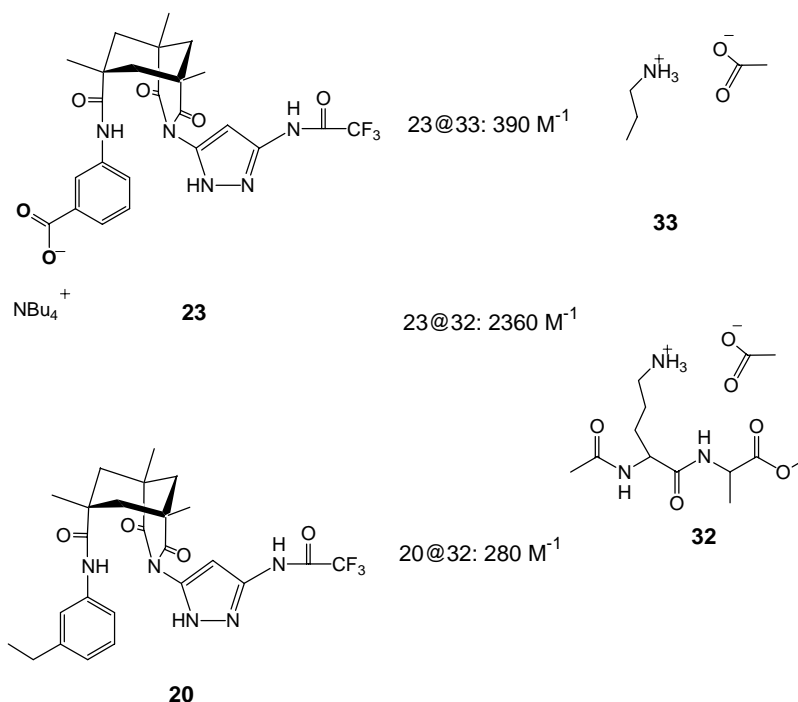


Abb. 80.: Ergebnisse der Titrations von **23@33**, **23@32** und **20@32**; da weder der reine Gast **33** stark gebunden wird noch der Wirt **20** ohne das Carboxylat, nutzt **23** offenbar beide Erkennungsprozesse, nämlich die des Peptidrückgrats und die ionische Wechselwirkung mit der kationischen Seitenkette.

Diese Bindungsstudien zeigen, daß für die Komplexbildung von **23@32** die ionische Wechselwirkung nicht die alleinige Kraft darstellt, sondern auch die Erkennung des Peptidrückgrats wirksam ist. Vergleicht man die Komplexe von **18** mit Wirt **23** und **20**, so erhält man eine Selektivität von 6: 1.

Der starke Beitrag der Rückgraterkennung in **23@32** wird durch den relativ geringen Energiegewinn bei der Ionenpaarbildung erklärt. Wird **33** als Gast angeboten, so muß das Acetat-Gegenion vom n-Propylaminkation abgelöst werden und wird durch das Benzoat von **23** ersetzt. Der Energieunterschied dieser beiden Zustände ist wahrscheinlich klein, wodurch eine relativ niedrige Bindungskonstante ( $390 \text{ M}^{-1}$ ) resultiert. Dieser geringe Energiegewinn trifft jedoch auch auf die Ionenpaarbildung mit der  $\text{NH}_3^+$ -Gruppe vom Rest des Ornithins zu. Der Unterschied zwischen den beiden Komplexen besteht vor allem darin, daß bei der Komplexbildung des Peptidrückgrats in **23@32** das Ammoniumion vom Ornithin in die Nähe des Benzoats gelangt. Erst durch diese Vororientierung des Seitenarms führt der Austausch des Acetatgegenions durch das Carboxylat von **23** zu einem Energiegewinn. Der kooperative

Effekt von ionischer Wechselwirkung und Wasserstoffbrücken führt dann zu der wesentlich stärkeren Bindung von **32**.

Die berechnete Struktur des Komplexes zeigt die gute Vororientierung von **23@32** ( Abb. 81) .

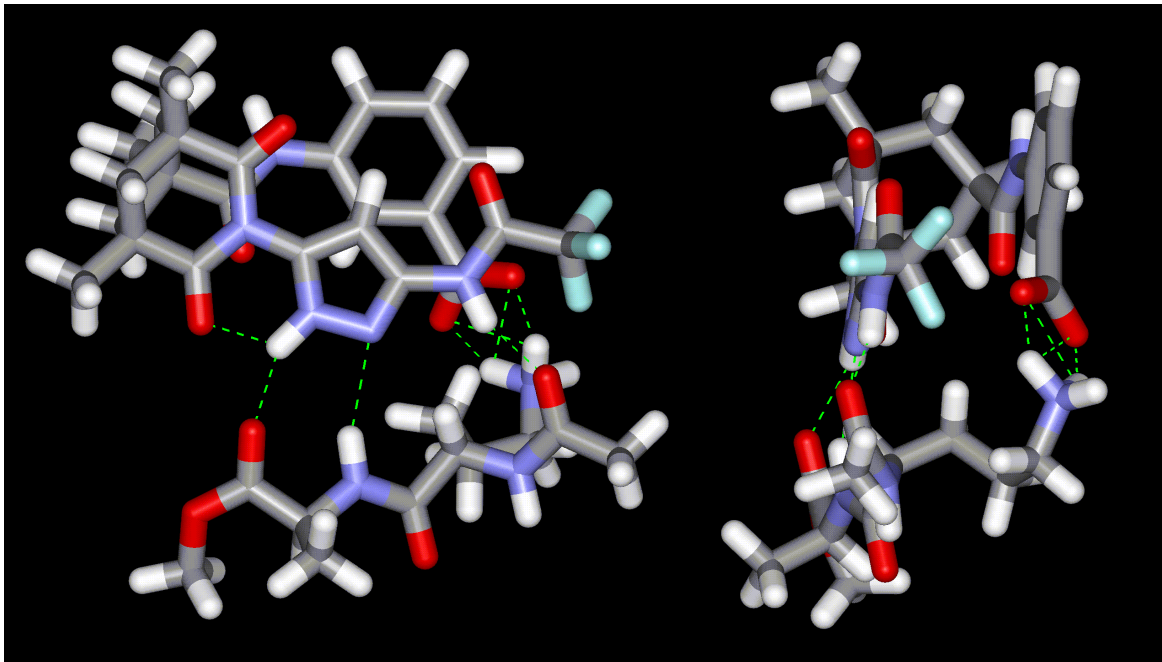


Abb. 81.: berechneter Komplex **23@32**, *links*: Seitenansicht; *rechts*: Frontansicht, man erkennt, wie gut das Carboxylat des Seitenarms von **23** für eine Bindung an den des Ornithins vororientiert ist ( MM, Amb<sup>\*</sup>or).

Ist auch hier die Stellung am *N*-Terminus für eine Bindung entscheidend? Die Struktur von Ac-Gly-Lys-OMe-HTos **34** ist der von **32** ähnlich, trägt aber Lysin am *C*-Terminus. Die NMR-Titration von **23@34** ergab eine Bindungskonstante von nur  $130 \text{ M}^{-1}$ , eine Größenordnung kleiner als **23@32** ( Abb. 82) . Erneut scheint die zusätzliche ionische Wechselwirkung am *N*-Terminus des Peptids zu funktionieren.

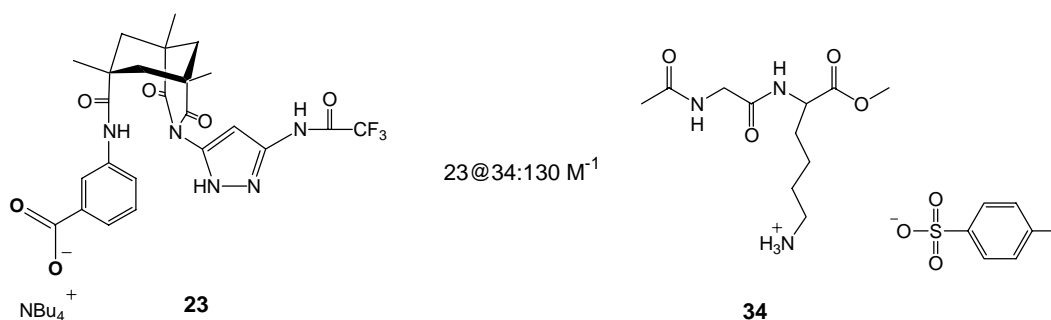


Abb. 82.: Ergebnis der Bindungsstudie von **23**@**35**; obwohl dem Wirt das Peptidrückgrat und eine positiv geladene Seitengruppe angeboten wird, ist die Bindung sehr schwach.

**23** ist also kein Wirt, der irgendein Dipeptid mit geladenem Seitenarm komplexiert, sondern das Dipeptide **32** auswählt, für das er maß geschneidert wurde.

Mit den in 2.6.2 bis 2.6.4 vorgestellten Wirtmolekülen konnte gezeigt werden, daß Peptidrezeptormoleküle durch rationales Design entworfen werden können, die selektiv für bestimmte Klassen von proteinogene Aminosäuren sind. Durch diesen allgemeinen Ansatz können Module erhalten werden, die jeweils eine bestimmte nicht-kovalente Wechselwirkung ausnutzen, um die spezifische Seitenkette der Aminosäuren vom *N*-Terminus erkennen. Durch den sterischen Anspruch der Wirte verlangen diese auch am *C*-Terminus eine schlanke Aminosäure wie Alanin.

Die Anwendbarkeit des Konzepts des rationalen Designs auf Komplexierungsprobleme von Peptiden konnte durch die Variation der sehr unterschiedlichen nicht-kovalenten Wechselwirkungen gezeigt werden.

## 2.7. Verifizierung der berechneten Komplexe

Die Größe der  $^3J(\text{H}, \text{H})$ -Kopplung hängt neben Substituenteneinflüssen wesentlich vom Molekülbau ab. Dabei sind die Bindungslänge  $l$ , die Bindungswinkel  $\alpha$  und die Torsionswinkel  $\phi$  von Bedeutung (Abb. 85) [151, 156-157]

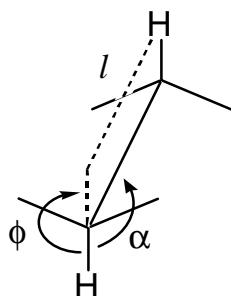


Abb. 85.: Erläuterung der drei Größen  $l$ ,  $\alpha$  und  $\phi$

Bei „frei“ drehbaren Bindungen ändert sich die Größe der Kopplungskonstante  $^3J$  mit dem Torsionswinkel  $\phi$ . Karplus<sup>[158]</sup> leitete als erster eine mathematische Beziehung zwischen diesen beiden Größen her. Dabei liegt der Mittelwert zwischen drei gleich stark populierte gestaffelten Konformationen in Alkanen ungefähr bei 7 Hz.

Die Amidbindung besitzt eine starre, planare Struktur mit einem 40%igen Doppelbindungscharakter, weil so die  $\pi$ -Orbitale von Stickstoff-, Kohlenstoff- und Sauerstoffatom maximal überlappen können. Mit diesen Vorgaben kann die Gerüstkonformation eines Polypeptids lediglich durch die Angabe der Torsionswinkel um die  $\text{C}_\alpha$ -N-Bindung und die  $\text{C}_\alpha$ -C'-Bindung der einzelnen Aminosäuren beschrieben werden. Nach einer Konvention werden diese Winkel  $\phi$  und  $\psi$  genannt (Abb. 86).

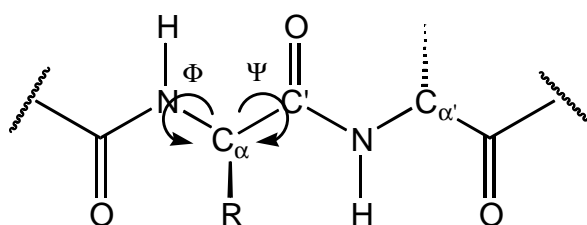


Abb. 86.: Bezeichnung der Torsionswinkel in Peptiden

Durch Untersuchungen von Nè el und Ramachandran konnte die Karplus-Beziehung auf die Kopplungskonstanten und die Konformation des Peptidrückgrats angewendet werden.

Allgemein kann gesagt werden, daß eine Dublett-Aufspaltung der Amidprotonen mit  $J_{(H, H)}$  kleiner als 6 Hz einer  $\alpha$ -helicalen, zwischen 7 Hz und 8 Hz einer Vorzugskonformation, und wesentlich größer als 7 Hz einer  $\beta$ -Faltblatt-Konformation im Peptid zuzuordnen sind. Dabei entspricht eine Aufspaltung von 10 Hz dem idealen  $\beta$ -Faltblatt. So haben beispielsweise die Amidprotonen von **16** in dem untersuchten Lösungsmittel eine Aufspaltung von 7 Hz, was einer ungeordneten Struktur im Polypeptid (random coil) entspricht.<sup>[159-161]</sup>

Das verwendete Programm MacroModel zur strukturellen Berechnung der Komplexe kann über die modifizierte Karplus-Beziehung aus den Torsionswinkeln des freien Peptids als auch der berechneten Komplexe die Kopplungskonstanten der entsprechenden N-H-Signale berechnen. Diese können anschließend mit den experimentellen Werten verglichen werden.<sup>[162]</sup>

Dabei ist zu beachten, daß die berechneten Kopplungskonstanten aus einem statischen Komplex stammen, wogegen die Bildung und der Zerfall der experimentell beobachteten Spezies einen dynamischen Prozeß darstellt, der schneller als die NMR-Zeitskala abläuft. Die gemessenen Kopplungskonstanten sind also Mittelwerte, aus dem Anteil an freien und komplexierten Spezies.

Die gemessenen Kopplungskonstanten sollten also in der Regel zwischen denen des freien Peptids und denen des statisch berechneten Komplexes liegen; eine Übereinstimmung ist nur bei sehr großen Bindungskonstanten zu erwarten.

	gemessen				berechnet	
	frei		teilweise komplexiert		komplexiert	
	H <sup>1</sup>	H <sup>2</sup>	H <sup>1</sup>	H <sup>2</sup>	H <sup>1</sup>	H <sup>2</sup>
<b>28</b>	6.3	6.3	6.6	7.6	8.7	9.7
<b>27</b>	7.3	7.6	6.6	8.3	5.4	6.6
<b>32</b>	5.3	6.0	7.0	6.4	6.5	6.7

Tab. 1.: berechnete und gemessene Kopplungskonstanten ( in Hz) der freien Dipeptide und ihren entsprechenden Komplexen mit den hergestellten Wirtverbindungen; *oben*: die Zuordnung der Wasserstoffe in den Dipeptiden.



---

In den meisten Fällen war die experimentell gefundene Kopplungskonstante wie erwartet zwischen dem Wert des freien Peptids und dem des berechneten reinen Komplexes. Dies korreliert mit den Ergebnissen der nicht-linearen Regression, die zeigen, daß eine Sättigung am Ende der Titration noch nicht erreicht war.

Die so gefundenen Daten zeigen, daß die berechneten Komplexe den Tatsächlichen ähnlich sind.

### 3. Zusammenfassung und Ausblick

Proteinfaltungskrankheiten wie die Alzheimer'sche oder Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) zeichnen sich durch unlösliche Proteinplaques in den Nervenzellen des Gehirns aus. Der Schlüsselschritt ist das Umfalten eines wasserlöslichen Prionproteinmonomers ( $\text{PrP}^{\text{F}}$ ), welches hauptsächlich in der  $\alpha$ -Helix existiert, in eine Struktur, die einen deutlich höheren  $\beta$ -Faltblattanteil ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) besitzt. Dieses Protein zwingt andere  $\text{PrP}^{\text{C}}$ -Moleküle ebenfalls in die  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Form, was zu hydrophoben Clustern führt, die schließlich ausfallen. Externe Template, die in der Lage sind die  $\beta$ -Faltblattregion von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  oder dem Alzheimerprotein A $\beta$  anzusteuern und eine weitere Aggregation zu verhindern oder diese rückgängig zu machen sind von großem medizinischem Interesse.

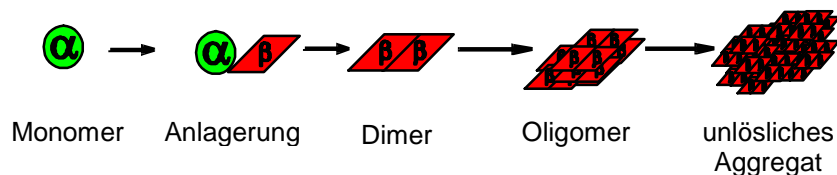


Abb. 87.: Mechanismus der Vermehrung von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  ( $\beta$ ) durch Umfaltung von  $\text{PrP}^{\text{F}}$  ( $\alpha$ ).

In unserem Arbeitskreis wurden mit acetylierten Aminopyrazolen die ersten intermolekularen Peptidrezeptoren dargestellt. Diese binden in Chloroform an ein Dipeptid und drängen es in die  $\beta$ -Faltblatt-Konformation, so daß sich die Aminosäure-Seitenketten waagrecht in der Ebene befinden.

Durch die komplementäre Anordnung von Wasserstoffbrückendonoren (D) und Akzeptoren (A) im Komplex ist die Verbindungsklasse der 3-Aminopyrazole für eine Bindung an Dipeptide ideal.

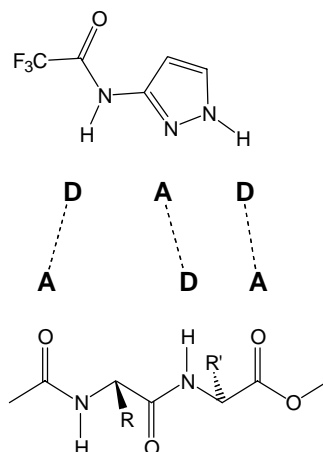


Abb. 87.: Bindung von 3-Tifluoracetylaminopyrazol an ein geschütztes Dipeptid

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aufbauend auf der Peptiderkennung durch Aminopyrazole zwei Themen bearbeitet:

1.) Die Wirtmoleküle der zweiten Generation sollen auch in polaren Lösungsmitteln an ein Peptidrückgrat binden. Dies konnte durch eine Erhöhung der Anzahl von Wasserstoffbrücken zwischen Wirt und Peptid realisiert werden. Zur Herstellung dieser  $\beta$ -Faltblatt-Liganden wurde das ringgeschützte Aminopyrazol mit verschiedenen Carbonsäuredichloriden amidisch Kopf-Kopf-verknüpft und anschließend mit Trifluoressigsäure wieder entschützt.

Durch diesen allgemeinen Ansatz konnte eine ganze Reihe von Dimeren erhalten werden. Die Bindungskonstanten der hergestellten Wirtverbindungen mit dem ausgewählten Tetrapeptid als Modell für ein Peptidrückgrat, *N*- und *C*-geschütztes tetra-Alanin **16** als Modell für ein Peptidrückgrat, wurden über NMR-Titrationen bestimmt (Abb. 88). Dabei wurde CDCl<sub>3</sub> mit 6% DMSO-d<sub>6</sub> verwendet.

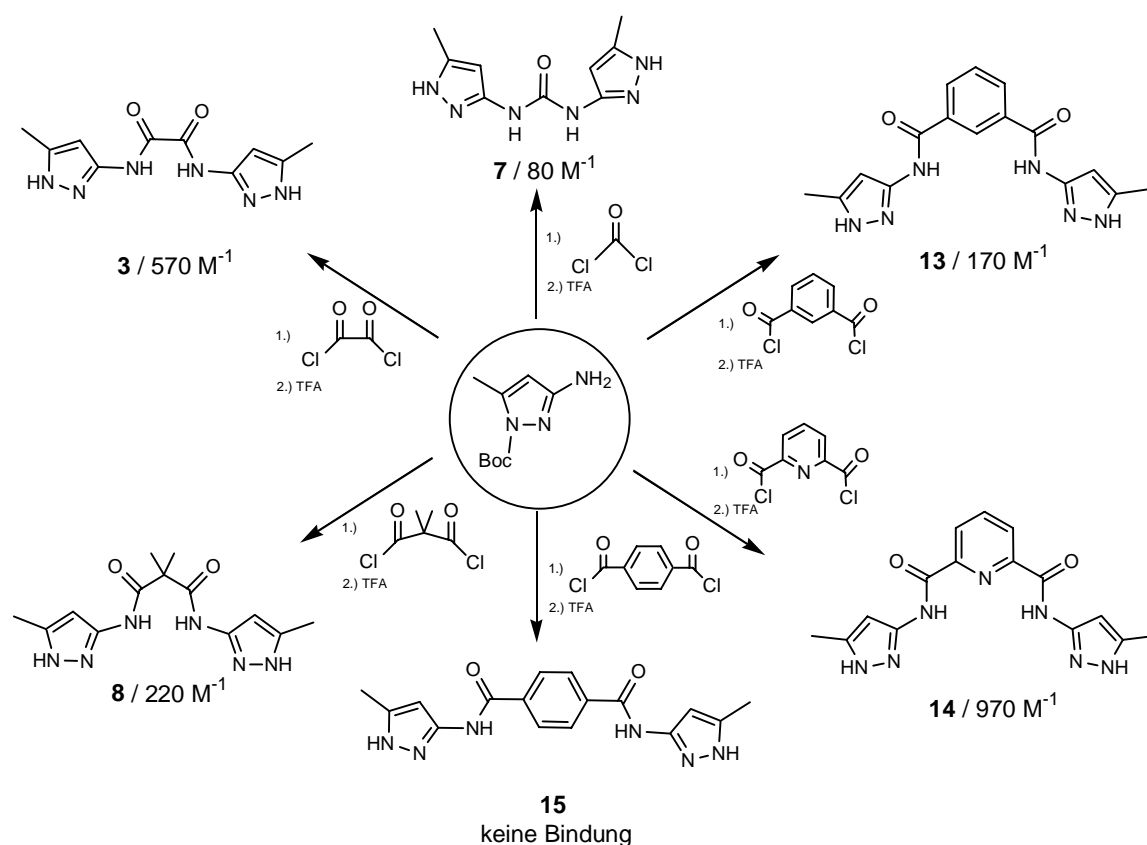


Abb. 89.: Darstellung der Kopf-Kopf-verknüpften Dimere, angegeben sind jeweils die Bindungskonstanten zu Ac-Ala<sub>4</sub>-OMe **16** in CDCl<sub>3</sub> mit 6% DMSO-d<sub>6</sub>.

Durch den Vergleich der erhaltenen Bindungskonstanten mit Molecular-Modelling Experimenten in Chloroform konnten im Laufe der Zeit optimierte Spacer gefunden werden. **3** komplexiert die Modellverbindung **16** durch Andocken von oben an sein Peptidrückgrat ( Abb. 90, links) . Der Oxalylspacer orientiert die Bindungsstellen exakt vor, so daß der beste in der Literatur beschriebene intermolekulare nicht-peptidische  $\beta$ -F altblattbinder entwickelt werden konnte.

Die Spacer der Wirtverbindungen **8**, **13** und **14** wurden gewählt, um im dimeren Pyrazolbindungsmuster einen Winkel zu erzeugen. Mit der Pyrazoleinheit sollten die Verbindungen in der Lage sein, an ein Peptid zu binden, welches in  $\beta$ -F altblatt vorliegt. Durch den Knick und die beiden Amidcarbonyle soll der Wirt **8** das komplexierte Peptidrückgrat in eine  $\alpha$ -Helix-Struktur umfalten können. Die höchste Bindungskonstante der drei Dimere mit **16** wurde für **14** bestimmt und betrug  $970 \text{ M}^{-1}$ . Die berechnete Geometrie des Komplexes zeigt jedoch, daß das Peptid an seinem mittleren C=O-Carbonylakzeptor in das V-förmige Bindungsmuster des Wirtes gezogen ( Abb. 90) , rechts) und dann um die Aminopyrazole gefädelt wird.

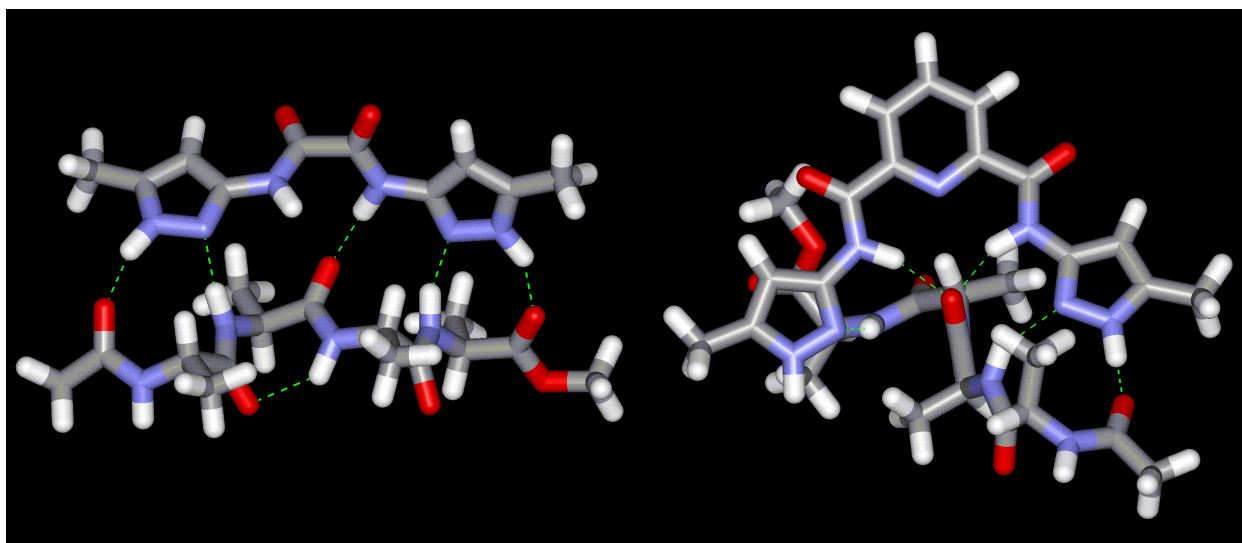


Abb. 90.: Berechnete Komplexe von **3**@**16** ( links) und **14**@**16** ( rechts) ; ( MM,  $\Delta$ MM,  $\Delta$ MC)

Nach diesen Untersuchungen wurden alle neuen Wirtverbindungen **3-15** in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Riessner in Düsseldorf an  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  und dem A $\beta$  getestet. Dazu wurden verschiedene Fällungsexperimente durchgeführt, in denen kontrolliert wurde, ob bei Anwesenheit einer der vorgestellten Verbindungen das Ausfallen des Prionproteins verhindert oder verlangsamt wird. Dies konnte auch tatsächlich beobachtet werden. Verbindung **3** war in der Lage, eine signifikante Menge  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  in Lösung zu halten. Bei denselben Bedingungen war in Referenzproben ohne Aminopyrazol sämtliches Protein ausgefallen. Entsprechende

Untersuchungen am A $\beta$ -Protein ergaben, daß entsprechende Einflüsse auf die Aggregation erzielt werden konnten.

Die hier vorgestellten  $\beta$ -Faltblattbinder könnten eines Tages vielversprechende neue Kandidaten für eine Therapie von Proteinfaltungskrankheiten werden. Dabei kann hier zum ersten Mal von einem echten rationalen Design gesprochen werden, das auch in die Optimierung einfließen sollte.

2.) Mit der entwickelten Technik des rationalen Designs von Rezeptoren aus 1.) soll nun mittels Molecular-Modelling ein Dipeptidrezeptor entworfen werden, der selektiv eine bestimmte Aminosäure erkennt. Um die Leistungsfähigkeit dieses Ansatzes zu belegen soll jeweils eine andere nicht-kovalente Wechselwirkung ausgenutzt werden, die eine Bindung zur spezifischen Seitenkette der angesteuerten Aminosäure eingeht. In der Literatur ist ein solcher rationaler Ansatz nach unserem Wissen bisher nicht beschrieben.

Dazu wurde das Trifluoräcetylaminopyrazol-Bindungsmuster (Abb. 87) beibehalten und das modifizierte Wirtmolekül um eine weitere Bindungsstelle erweitert. Dabei wird an ein starres U-förmiges Templatmolekül das Pyrazolderivat und die zusätzliche individuelle Erkennungseinheit gebunden. Die Synthese wurde so geplant, daß zunächst ein Grundbaustein erhalten wird, in dem die konservierten Strukturmerkmale enthalten sind. An diesen Baustein können dann verschiedene Seitengruppen gebunden werden, so daß einzelne Module erhalten werden, die sowohl das Peptidrückgrat als auch den spezifischen Rest einer Aminosäure erkennen.

Die Wirtverbindungen wurde dargestellt, indem zunächst ein einfach acyliertes Diaminopyrazol an die starre Kemp'sche Trisäure gebunden wurde. Im zweiten Schritt führte das Anknüpfen der individuellen Haftgruppe, einem substituierten Anilinderivat, in einer drei Stufen enthaltenden Eintopfreaktion, zum fertigen Rezeptor (Abb. 91). Durch die Variation des Substituenten an der Haftgruppe entsteht ein Baukastensystem, wobei jedes Modul die individuelle Seitengruppe einer bestimmten Aminosäureklasse ansteuert.

In dieser Arbeit wurden vier Wirtstrukturen synthetisiert, wobei in der Erkennungseinheit *m*-Aminoacetophenon, *m*-Ethylanilin, *m*-Nitroanilin und *m*-Aminobenzoesäurebenzylester eingesetzt wurden. Der Benzylester wurde durch Hydrogenolyse und Neutralisation der freien Säure mittels Tetrabutylammoniumhydroxid in das Benzoat überführt.

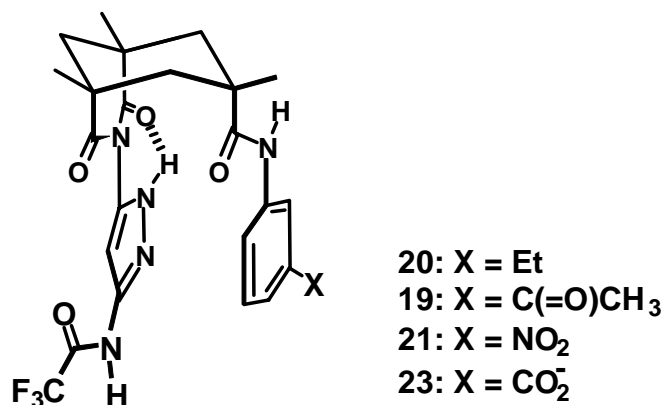


Abb. 91.: Allgemeine Struktur der sequenzselektiven Rezeptoren, durch Variation von X können unterschiedliche Reste Y einer Aminosäure im Dipeptid angesteuert werden.

Zunächst wurde die Auswirkung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung auf die Komplexbildungskonstante überprüft. Dabei bindet **19** mit den drei bekannten Haftpunkten und zusätzlich mit dem C=O-Wasserstoffbrückenakzeptor des Acetophenons. Zunächst wurde der Komplex von **19** mit Ac-Ala-Ala-OMe **26** untersucht, der ein  $K_a$  von 80 M<sup>-1</sup> ergab. Im Komplex Ac-Ser-Ala-OMe mit **28** wurde eine zehnmal stärkere Bindung von 900 M<sup>-1</sup> gemessen (Abb. 92). Um zu überprüfen, ob die synthetisierten Wirte hinsichtlich der terminalen Aminosäure eines Dipeptids selektiv sind, wurde der Komplex mit dem sterisch anspruchsvolleren Ac-Ser-Val-OMe **29** untersucht, das keine Bindung zeigte.

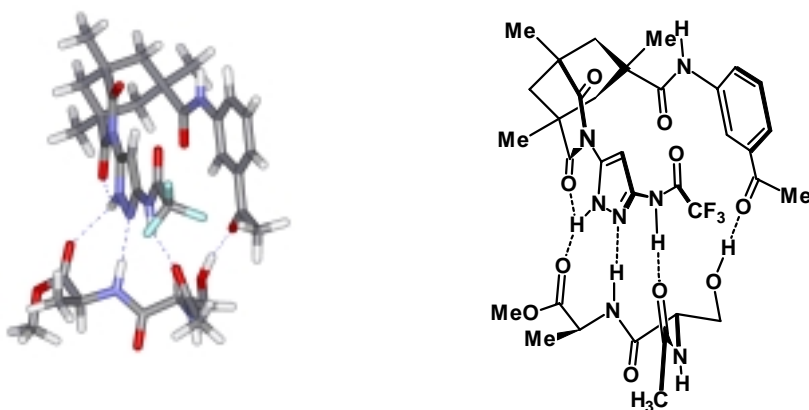


Abb. 92.: Komplexgeometrie von **19@28**; links: berechnet; rechts: Lewis-Struktur.

Für die Untersuchung einer ionischen Wechselwirkung wurde **23** mit Ac-Orn-Ala-OMe **32** als Hydroacetat titriert. Dabei ergab sich die höchste Bindungskonstante aller untersuchten Komplexe von 2360 M<sup>-1</sup>. Zur Bestimmung der reinen Coulomb-Anziehung wurde als Referenz ein einfacher ionischer Gast gewählt. Die NMR-Titration von

Propylaminhydroacetat mit **23** ergab eine Bindungskonstante von  $390 \text{ M}^{-1}$  ( Abb. 93) sechsmal schlechter als an **32**. Wirt **20**, der die Benzoatfunktion nicht besitzt, wurde Ornithin lediglich mit  $K_a = 280 \text{ M}^{-1}$  gebunden. Offensichtlich wirkt bei **23** sowohl die Rückgraterkennung als auch die Salzbrücke.

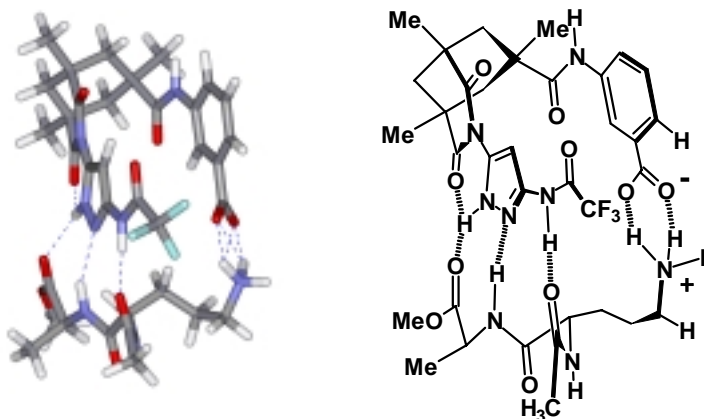


Abb. 93.: Komplexgeometrie von **23@32**; links: berechnet; rechts: Lewis-Struktur.

Für die Untersuchung einer  $\pi$ -Stapelung wurde als elektronenreiche Aminosäure Phenylalanin gewählt. Die Referenzsubstanz **20**, die durch den +I-Effekt des Ethylsubstituenten ebenfalls einen elektronenreichen Seitenarm besitzt, ergab im entsprechenden Komplex Ac-Phe-Ala-OMe **27** eine Bindungskonstante von nur  $45 \text{ M}^{-1}$ . Der sterisch ähnlich anspruchsvolle Wirt **21**, der sich durch die Nitrogruppe nur in den elektronischen Eigenschaften der Erkennungsgruppe von **20** unterscheidet, ergab aber im Komplex mit **27** eine Bindungskonstante von  $350 \text{ M}^{-1}$  ( Abb. 94) . Der Komplex ist also 7.5mal stärker als **20@27**.

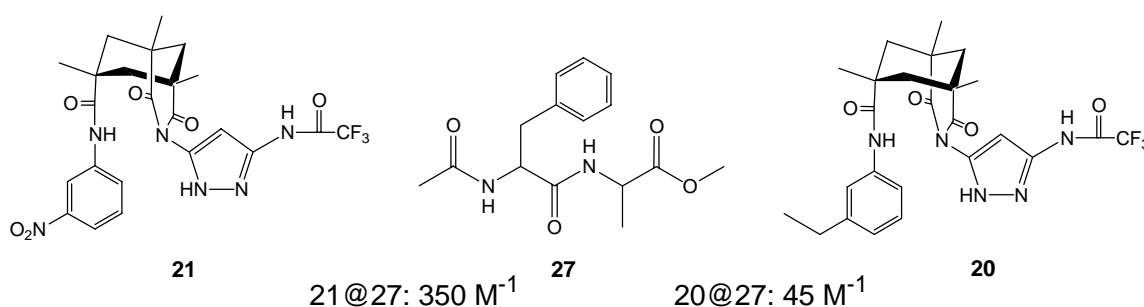


Abb. 94.: Bindungskonstanten von **21@27** und **20@27**.

Wirt **21** zeigt gegenüber dem Dipeptid Ac-Ala-Phe-OMe **31**, das eine umgekehrte Aminosäuresequenz besitzt, keinerlei Komplexierung. Er ist also hoch sequenzselektiv! Im Gegensatz zur kombinatorischen Synthese kann durch das Konzept des rationalen Designs die Selektivität für einzelne entworfenen Wirtverbindungen erklärt werden. Der Vergleich

von berechneten Strukturen und gemessenen Bindungseigenschaften der bekannten Komplexe, ermöglicht die gezielte Synthese von maß geschneiderten Wirtverbindungen für analoge Komplexierungsprobleme. Der verfolgte Ansatz konnte erfolgreich an mehreren selektiven Peptidrezeptormodulen realisiert werden. Dabei wurde die universelle Anwendbarkeit des Konzepts durch die Verwendung von unterschiedlichen nicht-kovalenten Wechselwirkungen gezeigt. Die einzelnen Module zeigen eine starke Bevorzugung von bestimmten Aminosäuren am *N*- und *C*-Terminus und sind zusätzlich sequenzselektiv.

## Ausblick

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse mit den im 1. Teil vorgestellten Dimeren, sollten längere lineare Aminopyrazolderivate angefertigt werden. Weil die Kopf-Kopf-verknüpften Derivate lediglich kurze Sequenzen erkennen können, sollte die Synthese von Kopf-Schwanz-verbrückten Derivaten angegangen werden. Diese können beliebig verlängert werden, also auch an das komplette Rückgrat eines Oligopeptids binden ( Abb. 95) .

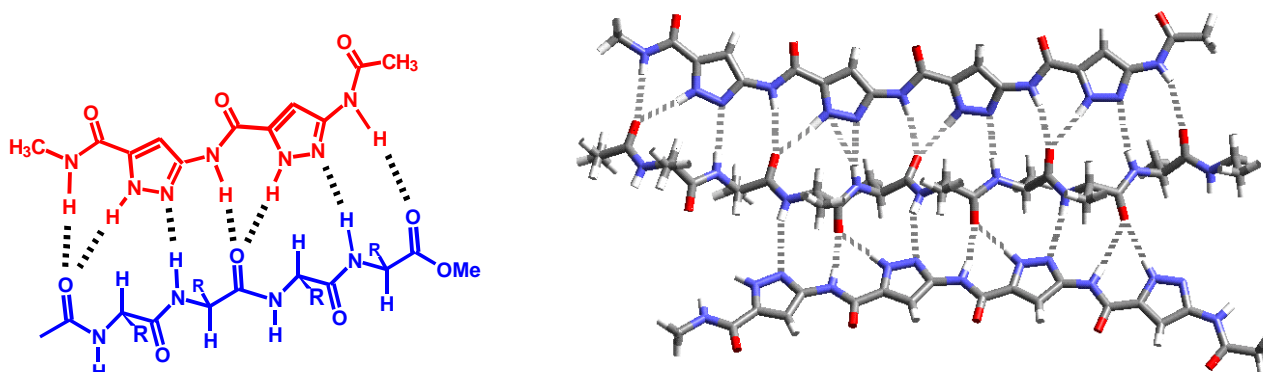


Abb. 95.: links: Kopf-Schwanz verknüpfte Aminopyrazoldimere, im Komplex mit einem Tetrapeptid, rechts: Bindung von zwei Pyrazoltetrameren an geschütztes nona-Glycin.

Diese Verbindungen sind analog zu den in 1.) vorgestellten potentielle neue Leitstrukturen, die ebenfalls in den Aggregationsprozeß von Prionproteinen eingreifen können.

Die Kombination der entwickelten Rezeptoren aus 1.) und 2.) ist ebenfalls denkbar. So könnten zwei Diaminopyrazole über einen Oxalylspacer verbrückt werden. An diese, zu 3 analoge Verbindung, sollte sich das Kemp' sche Trisäurerückgrat und eine Erkennungsgruppe binden lassen. Zunächst sollten dazu zwei gleiche Bindungsstellen gewählt werden ( Abb. 96) . Dieser neue Rezeptor könnte ein Tetrapeptid der Sequenz Ac-Ser-Ala-Ser-Ala-OMe erkennen.



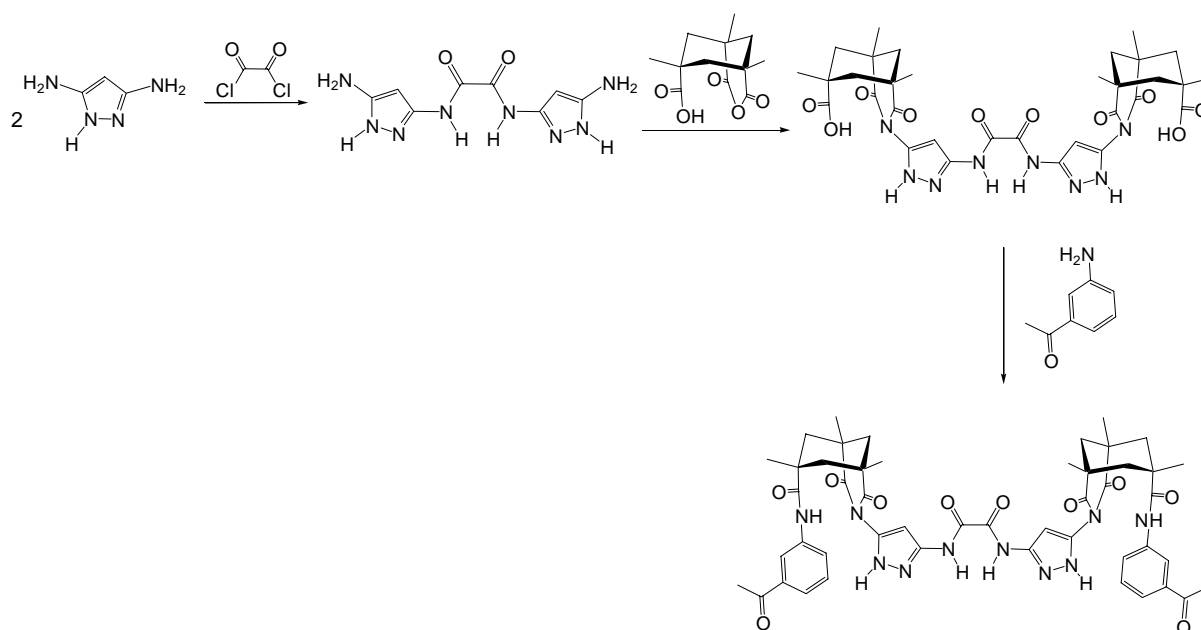


Abb. 96.: Schematische Synthese eines Rezeptors aus der Kombination der Bindungsmuster von **3** und **19**

Die in Abb. 96 exemplarisch vorgestellten Rezeptoren sind unter Umständen in der Lage auch in polaren Lösungsmitteln bestimmte Peptidsequenzen zu erkennen. Die bisher ermittelten Bindungskonstanten sind zwar im Gegensatz zu Pharmazeutika klein; diese können jedoch in der Regel auch nicht mehr Wasserstoffbrücken eingehen als die vorgestellten Verbindungen. Die hier verwendeten Dipeptide sind lediglich kleine Modellverbindungen, die mit den organisch-chemischen Methoden gut untersucht werden können. Natürliche Bindungsstellen sind im Gegensatz dazu meist hydrophobe Taschen, die eine unpolare Umgebung anbieten, die oftmals nicht weit von Chloroform entfernt ist. Deshalb könnte sogar eine medizinische Anwendung möglich sein, etwa bei der Komplexierung von *D*-Ala-*D*-Ala durch unsere künstlichen Peptidrezeptoren. Diese Peptidsequenz befindet sich in den Bausteinen der Zellwände von Bakterien, an die auch das Antibiotikum Vancomycin bindet. Zum Dipeptid werden hier ebenfalls nur fünf Wasserstoffbrücken ausgebildet.

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Allgemeine Methoden

#### 4.1.1 Apparatives

<sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie:	<i>Bruker Avance DRX 500 (500 MHz)</i> <i>Bruker Avance DRX 400 (400MHz)</i> <i>Bruker Avance AC 300 (300 MHz)</i>
<sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie:	<i>Bruker Avance AC 200 (200MHz)</i>
Massenspektrometrie:	
Elektronische Ionisation (EI):	<i>MAT CH 7A Finnigan</i>
Chemische Ionisation:	<i>INCOS 50 Finnigan</i>
Elektronen Spray Ionisation (ESI):	<i>MAT 95 S Finnigan</i>
Hochaufgelöste EI:	<i>MAT 711</i>
Hochaufgelöste ESI:	<i>MAT 95 S Finnigan</i>
Dünnschichtchromatographie:	<i>Kieselgel 60 F<sub>254</sub> auf Aluminiumfolie, Merck</i>
Säulenchromatographie:	<i>Kieselgel 60 (230-400 Mesh ASTM) von Merck</i>
Elementaranalyse:	<i>Varian Elementar Element Analysensysteme GmbH, Fachbereich Chemie</i>
Schmelzpunkte:	<i>Thermophan Reichert (nicht korrigiert)</i>
Kappen für NMR-Röhrchen:	<i>Wilmad</i>
Spritzen:	<i>1ml und 100µl Hamilton (gasdicht)</i>

### 4.1.2 Verwendete Chemikalien

Alle käuflichen Reagenzien wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

Aldrich	Pyridin-2,6-dicarbonsäuredichlorid
	Diethylmalondiimidat-dihydrochlorid
	Kemp'sche Trisäure
	Kaliumhexafluorophosphat
	DIEA
	Dichlormethan-d <sub>2</sub>
Fluka	3-Amino-5-Methyl-1 <i>H</i> -Pyrazol
	Oxalylchlorid
	Phosgen (20% in Toluol)
	Dimethylmalonsäuredichlorid
	meta-Nitroanilin
	Tetrabutylammoniumhydroxid
Merck	meta-Aminoacetophenon
	Terephthalsäuredichlorid
	Boc <sub>2</sub> O
	Pd/C
	Trifluoressigsäureanhydrid
	Malonsäuredinitril
	4-Methylmorpholin
	Ninhydrin (Sprühlösung)
NovaBiochem	Ac-Phe-OH
	Ac-Ala-OH
	Ac-Val-OH
	H-Orn(Z)-OH
	H-Phe-OMe
	H-Val-OMe
	Boc-Val-OH

	H-Ser-OMe
Bachem	Ac-Ser(tBu)-OH H-Ala-OMe Ac-Ala-Ala-OMe Ac-Ala-Ala-Ala-Ala-OMe
Lancaster	Isophthalsäuredichlorid
Clariant	Tris-Propanphosphonsäureanhydrid
Deutero	Chloroform-d <sub>1</sub> Methanol-d <sub>4</sub> Dimethylsulfoxid-d <sub>6</sub> Acetonitril-d <sub>3</sub>

Das verwendete Tris-Propanphosphonsäureanhydrid wurde vor der Reaktion zu einer 50%igen Lösung mit abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verdünnt (T3P).<sup>[165-167]</sup>

Alle für die Reaktionen verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert, bei Bedarf nach den literaturüblichen Verfahren getrocknet und über Molekularsieb 4D gelagert. Alle Reaktionen wurden unter Argon durchgeführt.

## 4.2 NMR-Untersuchungen

Für die angegebenen Verschiebungen, welche in  $\delta$ -Werten (ppm) angegeben sind, wurde das jeweilige deuteriumgekoppelte Signal als Standard verwendet.

Das für die NMR-Titrationen verwendete CDCl<sub>3</sub> wurde über Phosphorpentoxid vorgetrocknet und über gemörsertem Molekularsieb zum Rückfluß erhitzt. Vor jeder Titration wurde die benötigte Menge frisch abdestilliert. Das verwendete DMSO wurde drei Tage über Molekularsieb 4D gelagert.

Alle Titrationen wurden unter Schutzgas durchgeführt und die benutzten NMR-Röhrchen mit Teflonkappen gasdicht verschlossen.

### 4.2.1 Wirt-Gast-Experimente

Alle NMR-Titrationsen wurden am Bruker DRX 300 (300MHz) Spektrometer durchgeführt und die Proben mit je 256 Pulsen gemessen.

Dazu wurden jeweils zwei Stammlösungen angesetzt: Eine Stammlösung enthielt die angegebene Menge Gast und wurde in 7ml Lösungsmittel gelöst. Diese Lösung wurde gleichmäßig auf zehn NMR-Röhrchen verteilt (je 0.7 ml). Für die entsprechende Wirtstammlösung wurde die jeweils angegebene Menge Substanz im ebenfalls angegebenen Volumen (meist 1.5 ml) gelöst.

Nun wurden sukzessive definierte Mengen Wirtstammlösung zu den zehn Proben zugsetzt (in der Regel in Schritten von 40  $\mu$ l bis 400  $\mu$ l).

Zur Auswertung wurden scharfe und über den ganzen Bereich der Titration verfolgbare Signale der Gäste herangezogen. Die Bestimmung der Stabilitätskonstanten aus den  $\Delta\delta$ -Werten erfolgte durch nicht-lineare Regression der erhaltenen Titrationskurven mit dem PC-Programm SigmaPlot 2000. Der jeweilige Verlauf der Titration ist den Tabellen des Anhangs zu entnehmen.

### 4.2.2 Job-Plots

Es werden die jeweils angegebenen Mengen Wirt und Gast eingewogen und in den ebenfalls angegebenen Mengen Lösungsmittel gelöst. Nun werden die beiden Stammlösungen in definierten Mengen zusammen gegeben.

Die zur Auswertung herangezogenen Signale konnten im Verlauf der Titration eindeutig zugewiesen werden. Die eingesetzten Lösungsmittelmengen und entsprechenden Verschiebungen können dem Anhang entnommen werden.

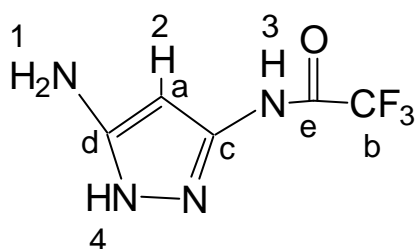
## 4.3 Synthesen

### 4.3.1. 5-Amino-3-trifluoracetylamino-1*H*-pyrazol 17

Eine Suspension von 3,5-Diaminopyrazol (4 g, 41 mmol) und Triethylamin (7.2 ml, 52 mmol) in 120 ml 1,4-Dioxan (abs., deox.) werden mit einer Lösung von 10ml 1,4-Dioxan (abs., deox.) und 6.2 ml Trifluoressigsäureanhydrid über 65 h versetzt. Anschließend wird das Lösemittel eingedampft und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel 60 mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Methanol (10:1) aufgereinigt ( $R_F$  = 0.46 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Methanol (5:1)), wobei ein weißer Feststoff anfällt.

**Ausbeute:** 1.87 g ( 9.6 mmol, 23,5 %)

**Schmelzpunkt:** 163°C



**<sup>1</sup>H NMR ( 500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25°C)**

$\delta$  = 5.06 (s, 2 H; 1),  $\delta$  = 5.56 (s, 1H; 2),  $\delta$  = 11.26 (br, 1H; 3),  $\delta$  = 11.49 (br, 1H; 4).

**<sup>13</sup>C NMR ( 126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25°C)**

$\delta$  = 81.1 (a),  $\delta$  = 116.3 (q,  $^1J(\text{C},\text{F}) = 288.7$  Hz; b),  $\delta$  = 144.6 (c),  $\delta$  = 148.8 (d),  $\delta$  = 154.0 (q,  $^3J(\text{C},\text{F}) = 36.3$ ; e).

**Massenspektrum (CI, NH<sub>3</sub>, 200°C)**

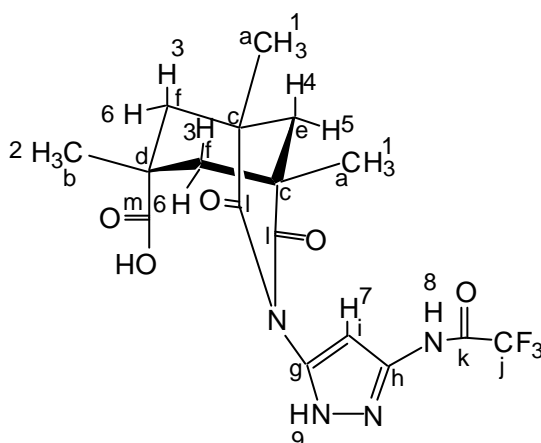
$m/z$  = 195 (M+H<sup>+</sup>)

### 4.3.2 1,5,7-Trimethyl-2,4-dioxo-3-[5-(2,2,2-trifluoroacetyl-amino)-2H-pyrazol-3-yl]-3-aza-bicyclo[3.3.1]-nonan-7-carbonsäure 18

In 150ml Toluol (abs.) wird eine Suspension von 1,3,5-trimethyl-1,3,5-cyclohexantricarbonsäureanhydrid (1.14 g, 4.8 mmol), **17** ( 0.94 g, 4.8 mmol) und Triethylamin ( 0.1 ml, 0.7 mmol) solange am Wasserabscheider zum Rückfluß erhitzt, bis sich kein Wasser mehr abscheidet. Darauf wird solange Lösungsmittel entfernt, bis in der Siedehitze ein Feststoff ausfällt. Man läßt bei  $-24^{\circ}\text{C}$  stehen, filtriert ab und erhält einen weißen Feststoff ( $R_F = 0.45$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :Methanol (5:1)).

**Ausbeute:** 1.88 g (4.5 mmol, 94 %)

**Schmelzpunkt:**  $221^{\circ}\text{C}$



#### $^1\text{H}$ NMR ( 500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $25^{\circ}\text{C}$ )

$\delta = 1.25$  (s, 6 H; 1),  $\delta = 1.26$  (s, 3H; 2),  $\delta = 1.43$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.9$ , 2H; 3),  $\delta = 1.66$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.2$ , 1H; 4),  $\delta = 2.10$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 12.6$ , 1H; 5),  $\delta = 2.53$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.9$ , 2H; 6),  $\delta = 6.55$  (br, 1 H; 7),  $\delta = 12.02$  (br, 1 H; 8),  $\delta = 12.48$  (br, 1 H; 9),

#### $^{13}\text{C}$ NMR ( 126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $25^{\circ}\text{C}$ )

$\delta = 25.1$  (a),  $\delta = 30.2$  (b),  $\delta = 39.9$  (c),  $\delta = 40.9$  (d),  $\delta = 41.7$  (e),  $\delta = 42.9$  (f),  $\delta = 59.7$  (g),  $\delta = 89.2$  (h),  $\delta = 96.5$  (i),  $\delta = 115.7$  (q,  $^2J(\text{C}, \text{F}) = 287.0$  Hz; j),  $\delta = 154.0$  (q,  $^3J(\text{C}, \text{F}) = 36.9$  Hz; (k),  $\delta = 175.4$  (l)  $\delta = 176.9$  (m).

**Massenspektrum (CI, NH<sub>3</sub>, 200°C)** $m/z = 417 (M+H^+)$ **Hochaufgelöstes Massenspektrum (EI)** $m/z = 416.1304$  (gem.)       $416.1308$  (ber.)       $0.0004$  (Diff.)**Elementaranalyse ber. für C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub>F<sub>3</sub>:**

C 49.04, H 4.60, N 13.46; gef.: C 49.56, H 4.38, N 12.94.

**4.3.2 Allgemeine Darstellung eines Amids aus 18 und einem Anilinderivat**

Eine Suspension aus 250 mg **18** (0.6 mmol) und 10 ml Boc<sub>2</sub>O (46.7 mmol) wird auf 90°C, 30 min über das dünnschichtchromatographisch verfolgte Verschwinden des Edukts hinaus, erwärmt. Das überschüssige Boc<sub>2</sub>O wird bei einer Wasserbadtemperatur von >70°C abkondensiert. Der verbleibende Feststoff wird in 40 ml Chloroform gelöst, mit 0.84 ml DIEA (4.8 mmol) und 0.89 g PyCloP (2.1 mmol) versetzt. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Die Lösung wird auf 50°C erwärmt und eine Suspension aus 25 ml Chloroform und 2.5 Äquivalenten Amin (1.5 mmol) wird über 3h zugetropft. Nach der Zugabe wird noch weitere 7h erwärmt, über Nacht bei Raumtemperatur und darauf weitere 6h bei 50°C gerührt.

Die Lösung wird eingedampft und das verbleibende gelbe Öl in wenig Essigester : n-Hexan (1:2) suspendiert und auf eine Gradientensäule an Kieselgel 60 mit Essigester : n-Hexan (1:2) gegeben. Diese lässt man über Nacht stehen und anschließend solange mit dem Lösungsmittel laufen, bis keine Substanz mehr eluiert wird, dann wird die Säule auf Essigester umgestellt. Das verunreinigte Produkt wird ein zweites Mal an Kieselgel 60 mit Essigester : n-Hexan (2:1) gesäult.

**4.3.3 1,5,7-Trimethyl-2,4-dioxo-3-[5-(2,2,2-trifluoracetyl-amino)-2H-pyrazol-3-yl]-3-aza-bicyclo[3.3.1]-nonan-7-carbonsäure-(3-ethyl-phenyl)-amid 20**

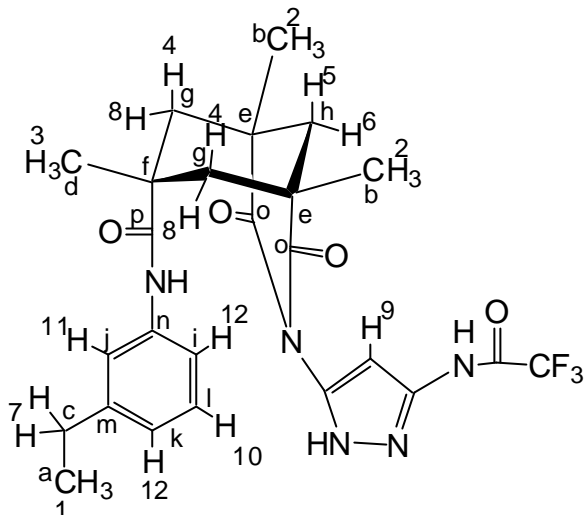
Die Darstellung erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift für Amide **4.3.2**

R<sub>F</sub> = 0.64 mit Essigester



**Ausbeute:** 0.1g (0.1 mmol, 23 %)

**Schmelzpunkt:** 152 °C



**$^1\text{H}$  NMR ( 300 MHz, Methanol- $\text{d}_4$ , 28°C)**

$\delta = 1.37$  (t,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.6$  Hz, 3 H; 1),  $\delta = 1.56$  (s, 6H; 2),  $\delta = 1.58$  (s, 3H; 3),  $\delta = 1.68$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 14.3$  Hz, 2H; 4),  $\delta = 1.83$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 12.9$  Hz, 1H; 5),  $\delta = 2.40$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 12.9$  Hz, 1 H; 6),  $\delta = 2.78$  (q,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.6$  Hz, 2 H; 7),  $\delta = 3.07$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 14.3$  Hz, 2 H; 8),  $\delta = 6.19$  (br, 1 H; 9),  $\delta = 7.15$  (t,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 4.0$  Hz, 1 H; 10),  $\delta = 7.32$  (s, 1 H; 11),  $\delta = 7.37$  (m, 2 H; 12)

**$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz, Methanol- $\text{d}_4$ , 25°C)**

$\delta = 15.9$  (a),  $\delta = 26.0$  (b),  $\delta = 29.2$  (c),  $\delta = 32.2$  (d),  $\delta = 41.4$  (e),  $\delta = 43.5$  (f),  $\delta = 45.6$  (g),  $\delta = 45.7$  (h),  $\delta = 110.4$  (i),  $\delta = 122.7$  (j),  $\delta = 126.4$  (k),  $\delta = 129.5$  (l),  $\delta = 136.3$  (m),  $\delta = 146.1$  (n),  $\delta = 176.0$  (o),  $\delta = 178.3$  (p).

**Massenspektrum (FD)**

$m/z = 519$  ( $\text{M}^+$ , 100%)

**Elementaranalyse ber. für  $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{N}_5\text{F}_3$ :**

C 57.80, H 5.43, N 13.48; gef.: C 57.87, H 5.82, N 13.75.

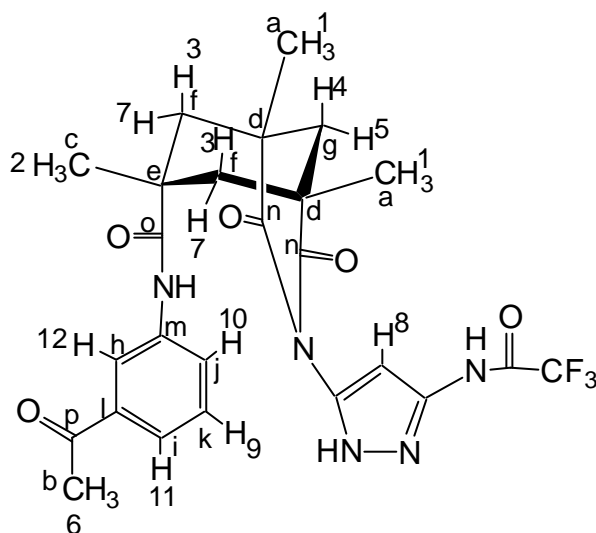
#### 4.3.4 1,5,7-Trimethyl-2,4-dioxo-3-[5-(2,2,2-trifluoroacetyl-amino)-2H-pyrazol-3-yl]-3-aza-bicyclo[3.3.1]-nonan-7-carbonsäure-(3-acetyl-phenyl)-amid 19

Die Darstellung erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift für Amide **4.3.2**

$R_F = 0.49$  mit Essigester

**Ausbeute:** 54 mg (0.1 mmol, 18 %)

**Schmelzpunkt:** 185 °C



#### $^1\text{H}$ NMR ( 500 MHz, Methanol- $d_4$ , 25°C)

$\delta = 1.32$  (s, 6H; 1),  $\delta = 1.35$  (s, 3H; 2),  $\delta = 1.49$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 14.5$  Hz, 2 H; 3),  $\delta = 1.64$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.9$  Hz, 1H; 4),  $\delta = 2.14$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.2$  Hz, 1H; 5),  $\delta = 2.52$  (s, 3H; 6)  $\delta = 2.83$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.9$  Hz, 2 H; 7),  $\delta = 5.93$  (br, 1 H; 8),  $\delta = 7.34$  (t,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.2$  Hz, 1 H; 9),  $\delta = 7.51$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.6$  Hz, 1 H; 10),  $\delta = 7.67$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.6$  Hz, 1 H; 11),  $\delta = 7.99$  (s, 1 H; 12)

#### $^{13}\text{C}$ NMR (50.4 MHz, Methanol- $d_4$ , 25°C)

$\delta = 25.9$  (a),  $\delta = 26.8$  (b),  $\delta = 31.4$  (c),  $\delta = 42.0$  (d),  $\delta = 43.7$  (e),  $\delta = 44.2$  (f),  $\delta = 44.9$  (g),  $\delta = 123.7$  (h),  $\delta = 125.8$  (i),  $\delta = 128.5$  (j),  $\delta = 130.0$  (k),  $\delta = 138.8$  (l),  $\delta = 139.6$  (m),  $\delta = 176.5$  (n),  $\delta = 178.3$  (o),  $\delta = 200.6$  (p).

**Massenspektrum (FD)**

$m/z = 533$  ( $M^+$ , 100%)

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (EI)**

$m/z = 533.1876$  (gem.)       $533.1886$  (ber.)       $0.001$  (Diff.)

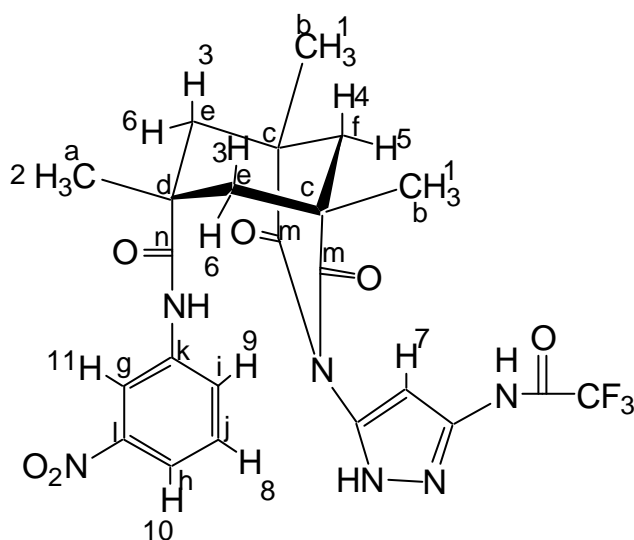
**4.3.5 1,5,7-Trimethyl-2,4-dioxo-3-[5-(2,2,2-trifluoracetyl-amino)-2H-pyrazol-3-yl]-3-aza-bicyclo[3.3.1]-nonan-7-carbonsäure-(3-nitro-phenyl)-amid 21**

Die Darstellung erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift für Amide **4.3.2**

$R_F = 0.58$  mit Essigester

**Ausbeute:** 85 mg (0.1 mmol, 18 %)

**Schmelzpunkt:** 208 °C

 **$^1\text{H}$  NMR ( 300 MHz, Methanol- $d_4$ , 28°C)**

$\delta = 1.31$  (s, 6H; 1),  $\delta = 1.34$  (s, 3H; 2),  $\delta = 1.47$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 14.9$  Hz, 2 H; 3),  $\delta = 1.61$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.2$  Hz, 1H; 4),  $\delta = 2.14$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.3$  Hz, 1H; 5),  $\delta = 2.84$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 14.3$  Hz, 2 H; 6),  $\delta = 5.93$  (br, 1 H; 7),  $\delta = 7.42$  (t,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.3$  Hz, 1 H; 8),  $\delta = 7.66$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 9.0$  Hz, 1 H; 9),  $\delta = 7.88$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 9.3$  Hz, 1 H; 10),  $\delta = 8.37$  (s, 1 H; 11)

**$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz, Methanol- $d_4$ , 25°C)**

$\delta = 26.0$  (a),  $\delta = 31.3$  (b),  $\delta = 42.0$  (c),  $\delta = 43.8$  (d),  $\delta = 44.3$  (e),  $\delta = 44.8$  (f),  $\delta = 117.9$  (g),  $\delta = 120.1$  (h),  $\delta = 128.9$  (i),  $\delta = 130.5$  (j),  $\delta = 140.6$  (k),  $\delta = 149.8$  (l),  $\delta = 176.3$  (m),  $\delta = 177.7$  (n).

**Massenspektrum (FD)**

$m/z = 536$  ( $M^+$ , 100%)

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (EI)**

$m/z = 536.1633$  (gem.)      533.1631 (ber.)      0.0002 (Diff.)

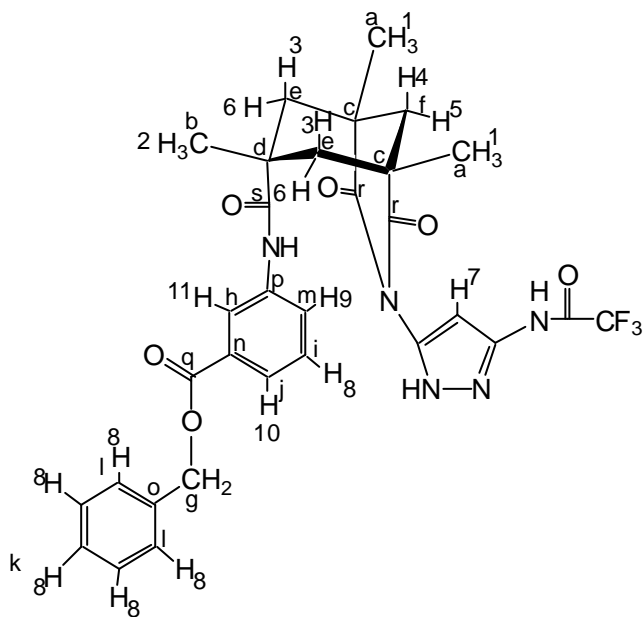
**4.3.6 3-({1,5,7-Trimethyl-2,4-dioxo-3-[5-(2,2,2-trifluoracetyl-amino)-2H-pyrazol-3-yl]-3-aza-bicyclo[3.3.1]-nonan-7-carbonyl}-amino)-benzoesäure-benzylester 24**

Die Darstellung erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift für Amide **4.3.2**

$R_F = 0.37$  mit Essigester : n-Hexan (2:1)

**Ausbeute:** 26 mg (0.04 mmol, 7 %)

**Schmelzpunkt:** 159 °C



**<sup>1</sup>H NMR ( 300 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>, 28°C)**

$\delta$  = 1.24 (s, 6H; 1),  $\delta$  = 1.28 (s, 3H; 2),  $\delta$  = 1.46 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 14.4$  Hz, 2 H; 3),  $\delta$  = 1.59 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.2$  Hz, 1H; 4),  $\delta$  = 2.18 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.4$  Hz, 1H; 5),  $\delta$  = 2.82 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.9$  Hz, 2 H; 6),  $\delta$  = 6.29 (s, 1 H; 7),  $\delta$  = 7.33 (m, 6 H; 8),  $\delta$  = 7.69 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.8$  Hz, 1 H; 9),  $\delta$  = 7.80 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.3$  Hz, 1 H; 10),  $\delta$  = 7.97 (s, 1 H; 11)

**<sup>13</sup>C NMR (50.4 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>, 25°C)**

$\delta$  = 25.9 (a),  $\delta$  = 31.2 (b),  $\delta$  = 41.4 (c),  $\delta$  = 43.1 (d),  $\delta$  = 43.8 (e),  $\delta$  = 44.7 (f),  $\delta$  = 67.8 (g),  $\delta$  = 122.9 (h),  $\delta$  = 126.0 (i),  $\delta$  = 126.8 (j),  $\delta$  = 128.8 (k),  $\delta$  = 129.3 (l),  $\delta$  = 129.8 (m),  $\delta$  = 131.5 (n),  $\delta$  = 137.4 (o),  $\delta$  = 139.4 (p),  $\delta$  = 166.4 (q),  $\delta$  = 175.6 (r),  $\delta$  = 176.4 (s).

**Massenspektrum (FD)**

m/z = 625 (M<sup>+</sup>, 100%)

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (EI)**

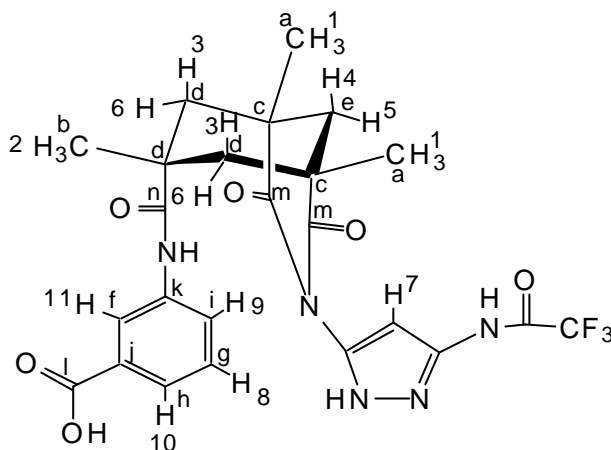
m/z = 625.2156 (gem.)      625.2148 (ber.)      0.0008 (Diff.)

**4.3.7 3-({1,5,7-Trimethyl-2,4-dioxo-3-[5-(2,2,2-trifluoracetyl-amino)-2H-pyrazol-3-yl]-3-aza-bicyclo[3.3.1]nonane-7-carbonyl}-amino)-benzoesäure 22**

**24** (50 mg, 0.08 mmol) wird in 50 ml Methanol gelöst und mit 55 mg Pd/C versetzt. Der Kolben wird mit einem mit Wasserstoff gefüllten Ballon versehen und 6h gerührt. Die Reaktionslösung wird über Kieselgur abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der verbleibende Feststoff wird je zweimal mit Essigester und Dichlormethan gewaschen.

**Ausbeute:**                      16 mg (0.03 mmol, 72 %)

**Schmelzpunkt:**            230 °C



**$^1\text{H}$  NMR ( 300 MHz, Methanol- $\text{d}_4$ , 28°C)**

$\delta$  = 1.31 (s, 6H; 1),  $\delta$  = 1.34 (s, 3H; 2),  $\delta$  = 1.44 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 14.3 Hz, 2 H; 3),  $\delta$  = 1.59 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 12.9 Hz, 1H; 4),  $\delta$  = 2.15 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 12.9 Hz, 1H; 5),  $\delta$  = 2.84 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 14.3 Hz, 2 H; 6),  $\delta$  = 5.93 (br, 1 H; 7),  $\delta$  = 7.28 (t,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 8.3 Hz, 1 H; 8),  $\delta$  = 7.57 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 8.0 Hz, 1 H; 9),  $\delta$  = 7.68 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 7.6 Hz, 1 H; 10),  $\delta$  = 7.87 (s, 1 H; 11)

**$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz, Aceton- $\text{d}_6$ , 25°C)**

$\delta$  = 26.0 (a),  $\delta$  = 31.5 (b),  $\delta$  = 41.9 (c),  $\delta$  = 44.1 (d),  $\delta$  = 45.0 (e),  $\delta$  = 124.5 (f),  $\delta$  = 126.8 (g),  $\delta$  = 126.9 (h),  $\delta$  = 129.5 (i),  $\delta$  = 129.5 (j),  $\delta$  = 139.2 (k),  $\delta$  = 173.9 (l),  $\delta$  = 176.3 (m),  $\delta$  = 178.1 (n).

**Massenspektrum (ESI-negativ)**

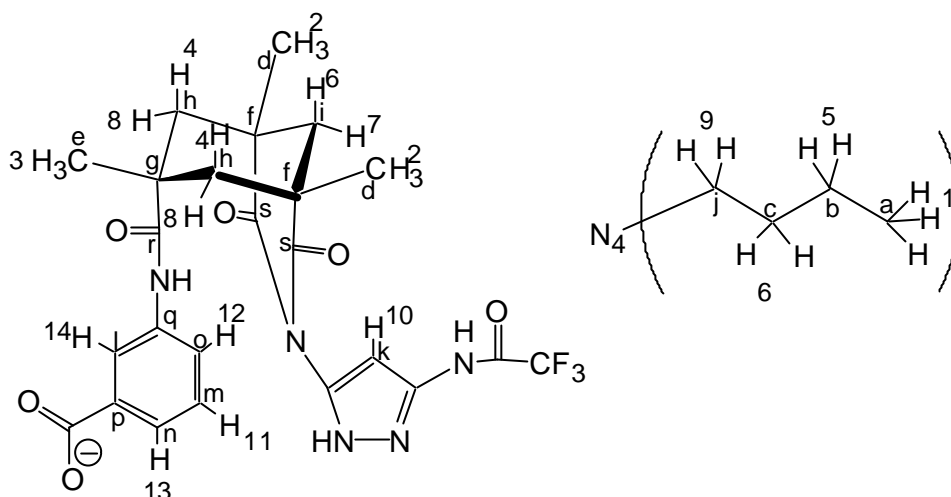
$m/z$  = 534 ( $\text{M}^+$ )

**4.3.8 tetra-Butylammonium-3-({1,5,7-Trimethyl-2,4-dioxo-3-[5-(2,2,2-trifluoracetyl-amino)-2H-pyrazol-3-yl]-3-aza-bicyclo[3.3.1]nonane-7-carbonyl}-amino)-benzoat**  
**23**

**22** (20 mg, 0.037 mmol) wird in 10 ml Methanol gelöst, mit 37  $\mu\text{l}$  1M  $\text{NBu}_4\text{OH}$  versetzt und die Lösung eingedampft.

**Ausbeute:** 28.7 mg (0.037 mmol, 100 %)

**Schmelzpunkt:** > 260 °C



**<sup>1</sup>H NMR ( 300 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>, 28°C)**

$\delta = 0.99$  (t,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.3$  Hz, 12 H; 1),  $\delta = 1.30$  (s, 6H; 2),  $\delta = 1.35$  (s, 3H; 3),  $\delta = 1.38$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 14.3$  Hz, 2 H; 4),  $\delta = 1.38$  (br, 8H; 5),  $\delta = 1.59$  (m, 9H; 6),  $\delta = 2.16$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.3$  Hz, 1H; 7),  $\delta = 2.83$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.9$  Hz, 2 H; 8),  $\delta = 3.18$  (m, 8H; 9),  $\delta = 5.87$  (br, 1 H; 10),  $\delta = 7.25$  (t,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.6$  Hz, 1 H; 11),  $\delta = 7.64$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.6$  Hz, 1 H; 12),  $\delta = 7.67$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 10.3$  Hz, 1 H; 10),  $\delta = 7.70$  (s, 1 H; 11)

**<sup>13</sup>C NMR (50.4 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>, 25°C)**

$\delta = 14.0$  (a),  $\delta = 20.7$  (b),  $\delta = 24.8$  (c),  $\delta = 26.2$  (d),  $\delta = 28.6$  (e),  $\delta = 31.6$  (f),  $\delta = 42.0$  (g),  $\delta = 44.2$  (h),  $\delta = 45.2$  (i),  $\delta = 59.6$  (j),  $\delta = 97.4$  (k),  $\delta = 124.0$  (l),  $\delta = 125.5$  (m),  $\delta = 126.6$  (n),  $\delta = 129.2$  (o),  $\delta = 139.0$  (p),  $\delta = 139.2$  (q),  $\delta = 176.2$  (r),  $\delta = 178.1$  (s).

**Massenspektrum (ESI-negativ)**

$m/z = 776$  ( $\text{M}^+$  (18%)),  $534$  ( $\text{M}-\text{H}^+$ , Carbonsäureanion ohne  $\text{NBu}_4^+$ , (100%))

**Hochaufgelöstes Massenspektrum: ber. ( $\text{M} - \text{NBu}_4$ )<sup>-</sup> (ESI-negativ)**

$m/z = 534.15947$  (gem.)       $534.16004$  (ber.)       $0.00057$  (Diff.)

### 4.3.9 *N*-Acetyl-*L*-phenylalaninyl-*L*-alaninmethylester 27

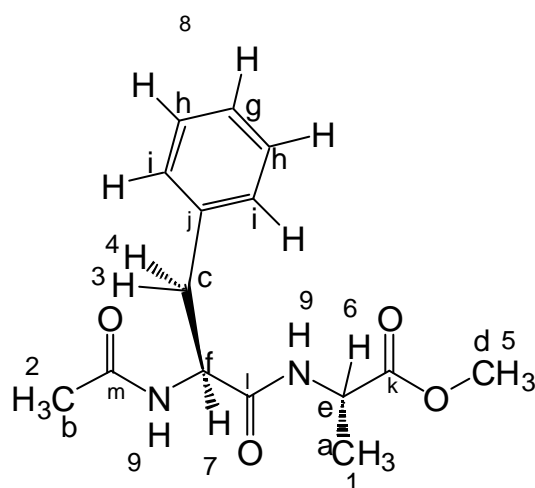
0.1 g *L*-Alaninmethylesterhydrochlorid (0.7 mmol), 0.2 g *N*-Acetyl-*L*-phenylalanin (1 mmol) und 0.55 ml NMM (5 mmol) werden in 50 ml Dichlormethan (abs.) gelöst und auf  $-10^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Es wird langsam 0.5 ml T3P (3.1 mmol) zugegeben, 3h in der Kälte und 3d bei Raumtemperatur gerührt.

Die Lösung wird eingedampft und mit Essigester und 1N HCl-Lösung, ges.  $\text{NaHCO}_3$ , ges. NaCl und dest. Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und eingedampft.

$R_F = 0.16$  mit Essigester

**Ausbeute:** 0.18 g (0.6 mmol, 88 %)

**Schmelzpunkt:**  $149^{\circ} - 155^{\circ}\text{C}$



#### $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ , $28^{\circ}\text{C}$ )

$\delta = 1.20$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.3$  Hz, 3 H; 1),  $\delta = 1.63$  (s, 3 H; 2),  $\delta = 2.60$  (dd,  $^2J(\text{H}, \text{H}) = 10.3$  Hz, 1 H; 3),  $\delta = 2.89$  (dd,  $^2J(\text{H}, \text{H}) = 4.3$  Hz, 1 H; 4),  $\delta = 3.52$  (s, 3 H; 5),  $\delta = 4.18$  (ddd,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.3$  Hz, 1 H; 6),  $\delta = 4.43$  (m, 1H; 7),  $\delta = 7.98$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.6$  Hz, 1 H; 8),  $\delta = 8.40$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.0$  Hz, 1 H; 9)

#### $^{13}\text{C}$ NMR (50.4 MHz, Methanol- $\text{d}_4$ , $25^{\circ}\text{C}$ )

$\delta = 17.4$  (a),  $\delta = 22.4$  (b),  $\delta = 39.0$  (c),  $\delta = 52.8$  (d),  $\delta = 55.8 + 55.9$  (e,f),  $\delta = 127.7$  (g),  $\delta = 129.4$  (h),  $\delta = 130.3$  (i),  $\delta = 138.5$  (j),  $\delta = 173.1 + 173.6$  (k, l),  $\delta = 174.4$  (m).



**Massenspektrum (EI)**

$m/z$  = 292 ( $M^+$ , 15%), 233 ( $M^+ - \text{CH}_3\text{C(O)NH}$ , 25%), 162 (22%), 159 (38%), 131 ( $^+\text{C(O)NH-Ala-OMe}$ , 29%), 120 (100%)

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (EI)**

$m/z$  = 292.1422 (gem.)      292.1423 (ber.)      0.0001 (Diff.)

**Elementaranalyse ber. für  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{N}_2$ :**

ber.: C 61.63, H 6.90, N 9.58; gef.: C 61.53, H 7.39, N 10.14.

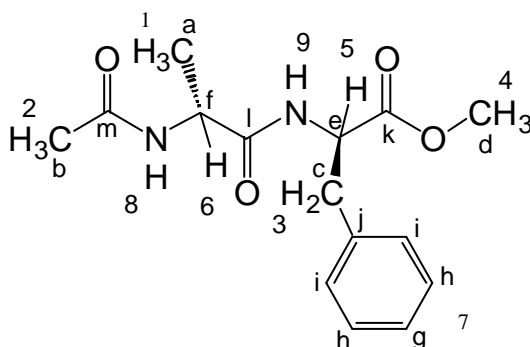
**4.3.10 *N*-Acetyl-*L*-alaninyl-*L*-phenylalaninmethylester 31**

0.48 g *N*-Acetyl-*L*-alanin (3.7 mmol), 0.78 g *L*-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid (3.6 mmol) und 2.5 ml NMM (23 mmol) werden in 50 ml Dichlormethan (abs.) gelöst und auf  $-10^\circ\text{C}$  abgekühlt. Es wird langsam 2.6 ml T3P (16 mmol) zugegeben, 3h in der Kälte und 3d bei Raumtemperatur gerührt.

Die Lösung wird eingedampft und mit Essigester und 1N HCl-Lösung, ges.  $\text{NaHCO}_3$ , ges. NaCl und dest. Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und eingedampft. Der Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : Methanol (20:1),  $R_F$  = 0.23)

**Ausbeute:**                      0.65g (2.2 mmol, 61 %)

**Schmelzpunkt:**            122  $^\circ\text{C}$



**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , 28°C)**

$\delta = 0.94$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 2.0$  Hz, 3 H; 1),  $\delta = 1.60$  (s, 3 H; 2),  $\delta = 2.80$  (m, 2 H; 3),  $\delta = 3.39$  (s, 3 H; 4),  $\delta = 4.10$  (m, 1 H; 5),  $\delta = 4.26$  (m, 1 H; 6),  $\delta = 7.02$  (m, 5 H; 7),  $\delta = 7.78$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.0$  Hz, 1 H; 8),  $\delta = 8.07$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.6$  Hz, 1 H; 9).

 **$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz, Methanol- $\text{d}_4$ , 25°C)**

$\delta = 18.1$  (a),  $\delta = 22.6$  (b),  $\delta = 50.2$  (c),  $\delta = 52.8$  (d),  $\delta = 54.9 + 55.2$  (e, f),  $\delta = 128.0$  (g),  $\delta = 129.6$  (h),  $\delta = 130.4$  (i),  $\delta = 138.0$  (j),  $\delta = 173.0 + 173.3 + 175.0$  (k, l, m).

**Massenspektrum (FD)**

$m/z = 292$  ( $\text{M}^+$ )

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (EI)**

$m/z = 292.1421$  (gem.)      292.1423 (ber.)      0.0002 (Diff.)

**4.3.11 *N*-Acetyl-(*O*-*t*-butyl)-*L*-serinyl-*L*-alaninmethylester 35**

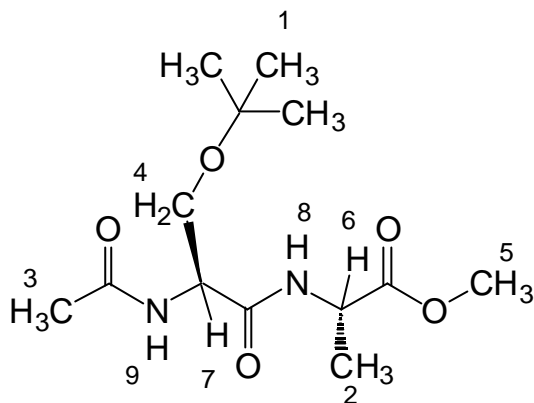
0.61 g *N*-Acetyl-(*O*-*t*-butyl)-*L*-serin (3 mmol), 0,43 g *L*-Alaninmethylester hydrochlorid (3 mmol) und 1.8 ml NMM (16.4 mmol) werden in 50 ml Dichlormethan (abs.) gelöst und auf  $-10^\circ\text{C}$  abgekühlt. Es wird langsam 2.1 ml T3P (13 mmol) zugegeben, 3h in der Kälte und 3d bei Raumtemperatur gerührt.

Die Lösung wird eingedampft und mit Essigester und 1N HCl-Lösung, ges.  $\text{NaHCO}_3$ , ges. NaCl und dest. Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und eingedampft.

Das erhaltene Rohprodukt ist NMR-sauber und wird ohne weitere Reinigung eingesetzt.

**Ausbeute:**                      0.32 g (1.1 mmol, 37 %, Rohprodukt)

**Schmelzpunkt:**            108 °C



**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 28°C)**

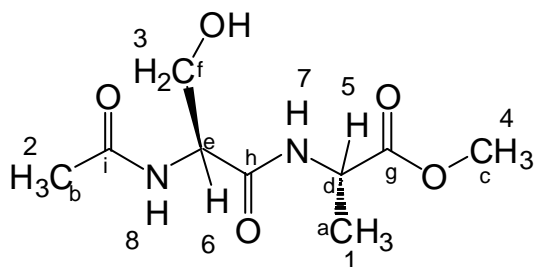
$\delta = 1.17$  (s, 9 H; 1),  $\delta = 1.34$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = \text{Hz}$ , 3 H; 2),  $\delta = 1.91$  (s, 3 H; 3),  $\delta = 2.60$  (dd,  $^2J(\text{H}, \text{H}) = 10.3$  Hz, 1 H; 3),  $\delta = 2.89$  (dd,  $^2J(\text{H}, \text{H}) = 4.3$  Hz, 1 H; 4),  $\delta = 3.52$  (s, 3 H; 5),  $\delta = 4.18$  (ddd,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.3$  Hz, 1 H; 6),  $\delta = 4.43$  (m, 1H; 7),  $\delta = 7.98$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.6$  Hz, 1 H; 8),  $\delta = 8.40$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.0$  Hz, 1 H; 9)

**4.3.12 *N*-Acetyl-*L*-serinyl-*L*-alaninmethylester 28**

0.23 g **35** (0.8 mmol) werden in 40 ml Ameisensäure (p. A.) gelöst und über Nacht stehen gelassen. Die Lösung wird eingedampft und der verbleibende Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : Methanol (20:1),  $R_F = 0.1$ ).<sup>[168-169]</sup>

**Ausbeute:** 0.12 g (0.5 mmol, 65 %)

**Schmelzpunkt:** 135 °C



**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 28°C)**

$\delta$  = 1.28 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = Hz, 3 H; 1),  $\delta$  = 1.86 (s, 3 H; 2),  $\delta$  = 3.54 (m, 2 H; 3),  $\delta$  = 3.62 (s, 3 H; 4),  $\delta$  = 4.30 (m, 1 H; 5),  $\delta$  = 7.91 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 7.0 Hz, 1 H; 6),  $\delta$  = 8.28 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 7.3 Hz, 1 H; 7)

 **$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz, Methanol- $d_4$ , 25°C)**

$\delta$  = 17.5 (a),  $\delta$  = 22.6 (b),  $\delta$  = 52.8 (c),  $\delta$  = 56.6 + 56.7 (d, e),  $\delta$  = 63.2 (f),  $\delta$  = 172.3 + 173.5 (g, h),  $\delta$  = 174.6 (i),.

**Massenspektrum (FD)**

$m/z$  = 233 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (ESI ber.:  $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_5\text{N}_2\text{Na}$ )**

$m/z$  = 255.09478 (gem.)      255.09569 (ber.)      0.0009 (Diff.)

**Elementaranalyse ber. für  $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_5\text{N}_2$ :**

C 46.55, H 6.94, N 12.06; gef.: C 45.59, H 6.48, N 12.00.

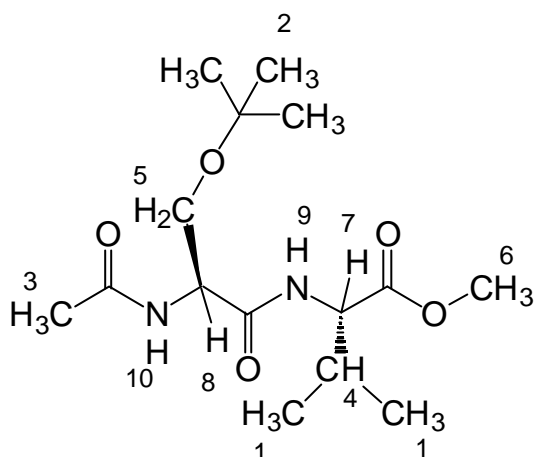
**4.3.13 *N*-Acetyl-(*O*-*t*-butyl)-*L*-serinyl-*L*-valinmethylester 36**

0.51 g *N*-Acetyl-(*O*-*t*-butyl)-*L*-serin (2.5 mmol), 0.39 g *L*-Valinmethylester hydrochlorid (2.3 mmol), 1.1g PyCloP (2.6 mmol) und 1.6 ml DIEA (9 mmol) werden in 50 ml Dichlormethan (abs.) 2d bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird eingedampft und der verbleibende Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Essigester,  $R_F$  = 0.44).

Das erhaltene Rohprodukt ist NMR-sauber und wird ohne weitere Reinigung eingesetzt.

**Ausbeute:**                      0.3 g (1.1 mmol, 48 %)

**Schmelzpunkt:**            107 °C



**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 28°C)**

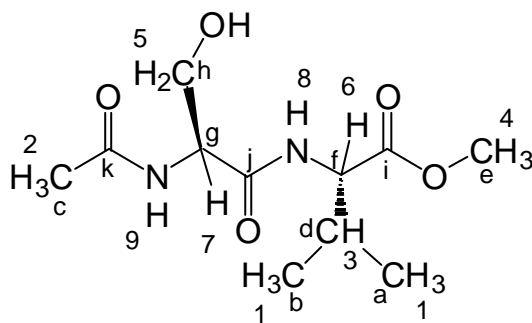
$\delta = 0.85$  (m, 6 H; 1),  $\delta = 1.08$  (s, 9 H; 2),  $\delta = 1.83$  (s, 3 H; 3),  $\delta = 2.00$  (m, 1 H; 4),  $\delta = 3.40$  (m, 2 H; 5),  $\delta = 3.60$  (s, 3 H; 6),  $\delta = 4.17$  (dd,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 6.6$  Hz, 1 H; 7),  $\delta = 4.41$  (dd,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.0$  Hz, 1 H; 8),  $\delta = 7.89$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.3$  Hz, 1 H; 9),  $\delta = 8.00$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.6$  Hz, 1 H; 10)

**4.3.14 *N*-Acetyl-*L*-serinyl-*L*-valinmethylester 29**

0.2 g **36** (0.63 mmol) werden in 40 ml Ameisensäure (p. A.) gelöst und über Nacht stehen gelassen. Die Lösung wird eingedampft und der verbleibende Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Essigester,  $R_F = 0.11$ ).

**Ausbeute:** 84 mg (0.3 mmol, 51 %)

**Schmelzpunkt:** 129 °C



**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , 28°C)**

$\delta = 0.86$  (m, 6 H; 1),  $\delta = 1.85$  (s, 3 H; 2),  $\delta = 2.03$  (m, 1 H; 3),  $\delta = 3.62$  (s, 3 H; 4),  $\delta = 4.20$  (m, 3 H; 5 + 6),  $\delta = 4.72$  (m, 1H; 7),  $\delta = 8.22$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 11.0$  Hz, 1 H; 8),  $\delta = 8.31$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.0$  Hz, 1 H; 9)

 **$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz, Methanol- $\text{d}_4$ , 25°C)**

$\delta = 18.4 + 19.5$  (a + b),  $\delta = 22.5$  (c),  $\delta = 32.0$  (d),  $\delta = 52.6$  (e),  $\delta = 56.6 + 59.3$  (f, g),  $\delta = 63.0$  (h),  $\delta = 172.7 + 173.3 + 173.5$  (i, j, k).

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (ESI ber.:  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_2\text{Na}$ )**

$m/z = 283.12586$  (gem.)       $283.12699$  (ber.)       $0.00113$  (Diff.)

**Elementaranalyse ber. für  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_2$ :**

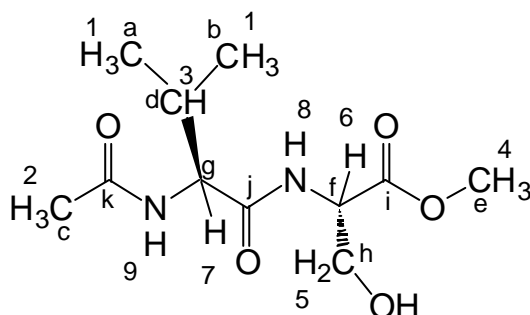
C 50.76, H 7.74, N 10.76; gef.: C 50.47, H 7.68, N 10.22.

**4.3.15 *N*-Acetyl-*L*-valinyl-*L*-serinmethylester 30**

0.67 g *N*-Acetyl-*L*-Valin (4.2 mmol), 0.61 g *L*-Serinmethylesterhydrochlorid (3.9 mmol), 2.1g PyCloP (5 mmol) und 2.6 ml DIEA (15 mmol) werden in 50 ml Dichlormethan (abs.) gelöst und 2d bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird eingedampft und der verbleibende Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : Methanol (20:1),  $R_F = 0.49$ )

**Ausbeute:**                      0,1 g (0,4 mmol, 9 %)

**Schmelzpunkt:**            212 °C



**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 28°C)**

$\delta$  = 0.99 (dd,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 7.0 Hz, 6 H; 1),  $\delta$  = 2.00 (s, 3 H; 2),  $\delta$  = 2.09 (m, 1 H; 3),  $\delta$  = 3.76 (s, 3 H; 4),  $\delta$  = 3.81 (m, 3 H; 5),  $\delta$  = 4.43 (m, 2 H; 6 + 7),  $\delta$  = 8.03 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 9.0 Hz, 1 H; 8),  $\delta$  = 8.41 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 7.3 Hz, 1 H; 9)

 **$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz, Methanol- $d_4$ , 25°C)**

$\delta$  = 17.3 + 18.6 (a + b),  $\delta$  = 22.4 (c),  $\delta$  = 32.0 (d),  $\delta$  = 52.7 (e),  $\delta$  = 56.2 + 60.2 (f, g),  $\delta$  = 62.8 (h),  $\delta$  = 172.1 + 173.4 (i, j),  $\delta$  = 173.9 (k).

**Massenspektrum (CI,  $\text{NH}_3$ , 200°C)**

$m/z$  = 261 ( $\text{M}+\text{H}^+$ , 59%), 278 ( $\text{M}+\text{NH}_3^+$ , 100%)

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (ESI ber.:  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_2\text{Na}$ )**

$m/z$  = 283.12599 (gem.)      283.12699 (ber.)      0.001 (Diff.)

**Elementaranalyse ber. für  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_2$ :**

C 50.76, H 7.74, N 10.76; gef.: C 50.47, H 7.68, N 10.22.

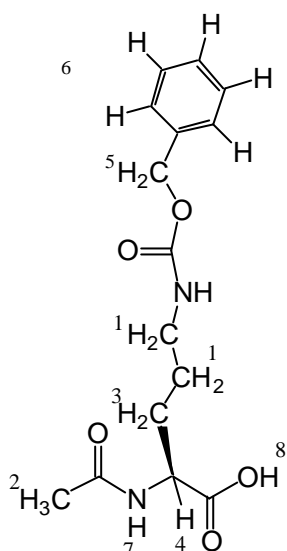
**4.3.16 *N*-Acetyl-*N*<sup>d</sup>-benzyloxycarbonyl-*L*-ornithin 37**

0.5g *N*<sup>d</sup>-benzyloxycarbonyl-*L*-ornithin (1.9 mmol) werden in 100 ml Wasser suspendiert und mit 1 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wird 15 Minuten Ultraschall ausgesetzt, erneut mit 1 ml Essigsäureanhydrid versetzt und wieder beschallt. Dieser Vorgang wird sechsmal wiederholt. Das Lösungsmittel wird eingedampft und noch dreimal mit Toluol (abs.) letzte Spuren durch eindampfen entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt ist NMR-sauber und wird ohne weitere Reinigung eingesetzt.

**Ausbeute:**                      0.58 g (1.9 mmol, 100 %)

**Schmelzpunkt:**            96 °C



**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , 28°C)**

$\delta = 1.58 - 2.08$  (m, 4 H; 1),  $\delta = 1.63$  (s, 3 H; 2),  $\delta = 3.16$  (q,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 6.3$  Hz, 2 H; 3),  $\delta = 4.31$  (m, 1 H; 4),  $\delta = 5.17$  (s, 2H; 5),  $\delta = 7.51$  (m, 5H; 6),  $\delta = 8.27$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.0$  Hz, 1 H; 7),  $\delta = 12.48$  (br, 1 H; 8)

**4.3.17 *N*-Acetyl-*N*<sup>d</sup>-benzyloxycarbonyl-*L*-ornithinyl-*L*-alaninmethylester 38**

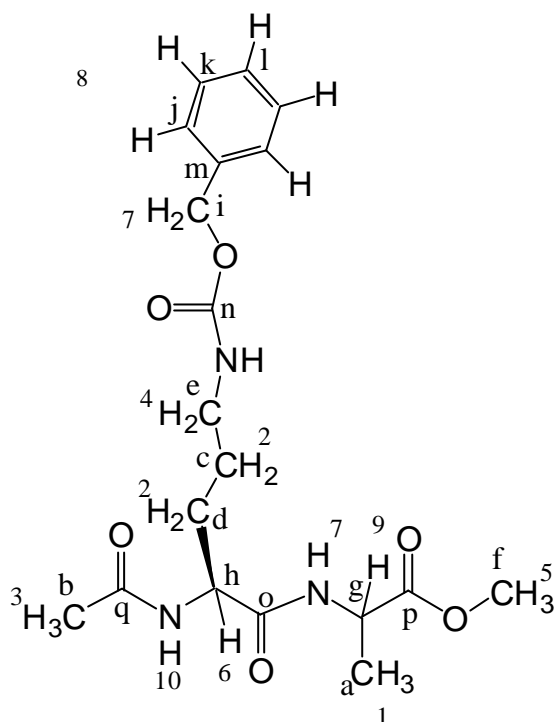
1.36 g **37** (4.4 mmol), 0.58 g *L*-Alaninmethylesterhydrochlorid (4.1 mmol) und 4 ml DIEA (23 mmol) und 2.1 g PyCloP (5 mmol) werden in 50 ml Dichlormethan (abs.) 3d bei Raumtemperatur gerührt.

Die Lösung wird eingedampft und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : Methanol (20:1),  $R_F = 0.08$ ). Das verbleibende Öl wird in Methanol : Diethylether umkristallisiert.

**Ausbeute:** 1.21 g (3.1 mmol, 75 %)

**Schmelzpunkt:** 176 °C





### $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 28°C)

$\delta = 1.28$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.3$  Hz, 3 H; 1),  $\delta = 1.42 - 1.67$  (m, 4 H; 2),  $\delta = 1.83$  (s, 3 H; 3),  $\delta = 2.98$  (q,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 6.0$  Hz, 2 H; 4),  $\delta = 3.60$  (s, 3 H; 5),  $\delta = 4.25$  (m, 2 H; 6),  $\delta = 5.01$  (s, 2 H; 7),  $\delta = 7.35$  (m, 5H; 8),  $\delta = 7.97$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.0$  Hz, 1 H; 9),  $\delta = 8.35$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.0$  Hz, 1 H; 10).

### $^{13}\text{C}$ NMR (50.4 MHz, Methanol- $d_4$ , 25°C)

$\delta = 17.4$  (a),  $\delta = 22.5$  (b),  $\delta = 27.4$  (c)  $\delta = 30.6$  (d),  $\delta = 41.3$  (e),  $\delta = 52.9$  (f),  $\delta = 54.2 + 56.0$  (g,h),  $\delta = 70.9$  (i),  $\delta = 128.9 + 129.1 + 129.6$  (j, k, l),  $\delta = 138.5$  (m),  $\delta = 159.1$  (n),  $\delta = 173.3 + 174.2 + 174.6$  (o, p, q).

### Massenspektrum (EI)

$m/z = 393$  ( $\text{M}^+$ , 5%),  $291$  ( $\text{Ac-Orn(Z)}^+$ , 6%),  $104$  ( $\text{Ala-OMe}+\text{H}^+$ , 16%),  $91$  ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2^+$ , 100%)

### Hochaufgelöstes Massenspektrum (EI)

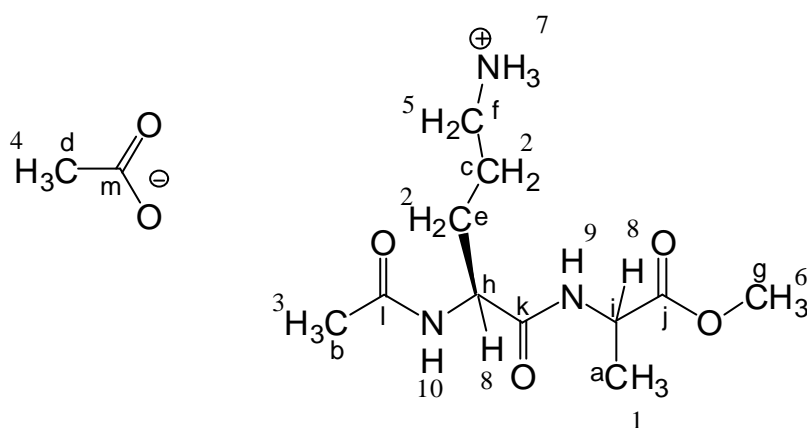
$m/z = 393.1900$  (gem.)       $393.1894$  (ber.)       $0.0006$  (Diff.)

**4.3.18 *N*-Acetyl-*L*-ornithinyl-*L*-alaninmethylester · hydroacetat 32**

0.2 g **38** (0.5 mmol) wurden in 40 ml Methanol gelöst und mit 10 ml Eisessig und 100 mg Pd/C versetzt. Es wird unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck über Nacht hydriert. Der Katalysator wird über Kieselgur abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Es verbleibt ein weißer Feststoff.

**Ausbeute:** 0.13 g (0.4 mmol, 81 %)

**Schmelzpunkt:** 40 °C

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 28°C)**

$\delta$  = 1.28 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 7.3 Hz, 3 H; 1),  $\delta$  = 1.45 – 1.70 (m, 4 H; 2),  $\delta$  = 1.82 (s, 3 H; 3),  $\delta$  = 1.83 (s, 3 H; 4),  $\delta$  = 2.61 (m, 1 H; 5),  $\delta$  = 3.61 (s, 3 H; 6),  $\delta$  = 4.14 (br, 3 H; 7),  $\delta$  = 4.26 (m, 2 H; 8),  $\delta$  = 8.05 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 8.0 Hz, 1 H; 9),  $\delta$  = 8.47 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 6.6 Hz, 1 H; 10).

**<sup>13</sup>C NMR (50.4 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>, 25°C)**

$\delta$  = 17.3 (a),  $\delta$  = 22.5 (b),  $\delta$  = 24.1 + 25.0 (c, d),  $\delta$  = 30.2 (e),  $\delta$  = 40.2 (f),  $\delta$  = 52.8 (g),  $\delta$  = 53.7 + 53.9 (h, i),  $\delta$  = 173.3 + 173.7 + 174.5 + 174.6 (j, k, l, m).

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (ESI berechnet: C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub> (M<sup>+</sup>-Ac)**

$m/z$  = 260.16110 (gem.)      260.16103 (ber.)      0.00007 (Diff.)

**Elementaranalyse ber. für C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>:**

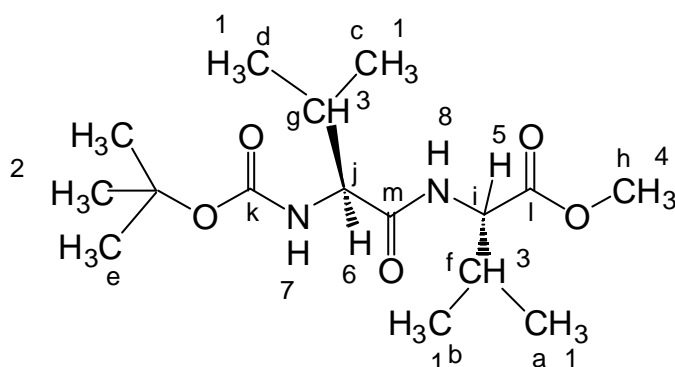
C 48.89, H 7.89, N 13.16; gef.: C 48.80, H 7.96, N 12.64.

#### 4.3.19 *N*-*t*-Butyloxycarbonyl-*L*-valinyl-*L*-valinmethylester 25

0.3 g *N*-*t*-Butyloxycarbonyl-*L*-valin (1.1 mmol), 0.23 g *L*-Valinmethylesterhydrochlorid (1.4 mmol), 0.58 g PyCloP (1.4 mmol) und 0.9 ml DIEA (5.2 mmol) werden in 50 ml Dichlormethan (abs.) gelöst und es wird über Nacht gerührt.  $R_f = 0.50$  mit Essigester : n-Hexan (1:2)

**Ausbeute:** 0.23 g (0.7 mmol, 65 %)

**Schmelzpunkt:** 167 °C



**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C)**

$\delta = 0.86$  (m, 3 H; 1),  $\delta = 1.40$  (s, 9 H; 2),  $\delta = 2.10$  (m, 2 H; 3),  $\delta = 3.67$  (s, 3 H; 4),  $\delta = 3.83$  (ddd,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.9$  Hz 1 H; 5),  $\delta = 4.48$  (ddd,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.6$  Hz, 1 H; 6),  $\delta = 4.95$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 6.0$  Hz, 1 H; 7),  $\delta = 6.25$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.6$  Hz, 1 H; 7)

**$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz, Methanol- $d_4$ , 25°C)**

$\delta = 17.7 + 17.8 + 18.8 + 19.2$  (a, b, c, d),  $\delta = 28.2$  (e),  $\delta = 30.5 + 31.2$  (f,g),  $\delta = 52.0$  (h),  $\delta = 57.0$  (i,j),  $\delta = 155.7$  (k),  $\delta = 171.5 + 172.0$  (l, m).

**Massenspektrum (FD)**

$m/z = 348$  ( $\text{M} + \text{NH}_4^+$ ; 100%),  $331$  ( $\text{M} + \text{H}^+$ ; 90%)

**Elementaranalyse ber. für  $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{N}_2$ :**

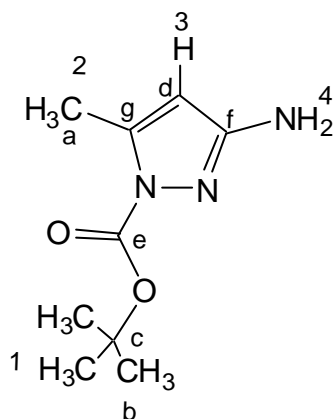
C 58.16, H 9.15, N 8.48; gef.: C 57.94, H 9.19, N 8.49.

**4.3.20 *N*-*t*-Butyloxycarbonyl-3-amino-5-methyl-pyrazol-1-yl 4**

2.1 g 3-Amino-5-methyl-1*H*-pyrazol (21.7 mmol) werden bei 0°C in 40 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (abs.) gelöst. Über ein Septum werden 5 ml Boc<sub>2</sub>O (23.4 mmol) zugetropft, es wird 2h in der Kälte und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird eingedampft und der verbleibende Rückstand in n-Hexan : Essigester umkristallisiert (R<sub>F</sub> = 0.66 mit Essigester : n-Hexan (1:2)).

**Ausbeute:** 3 g (10.8 mmol, 71 %)

**Schmelzpunkt:** 141 °C



**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C)**

δ = 1.36 (s, 9 H; 1), δ = 1.82 (s, 3 H; 2), δ = 4.96 (s, 1 H; 3), δ = 6.04 (br, 2 H; 4).

**<sup>13</sup>C NMR (50.4 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>, 25°C)**

δ = 15.2 (a), δ = 29.0 (b), δ = 84.8 (c), δ = 88.9 (d), δ = 151.4 + 152.8 + 153.0 (e, f, g).

**Massenspektrum (CI, NH<sub>3</sub>, 200°C)**

m/z = 348 (M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; 100%), 331 (M + H<sup>+</sup>; 90%)

**Elementaranalyse ber. für C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>:**

C 54.81, H 7.67, N 21.30; gef.: C 54.95, H 7.87, N 21.12.

#### 4.3.21 Allgemeine Darstellung von *N-N'*-(1-*t*-Butyloxycarbonyl-5-methyl-pyrazol-3-yl)-säurediamiden

2 Äquivalente **4** und 3 Äquivalente  $\text{NEt}_3$  werden in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (abs.) gelöst und bei  $0^\circ\text{C}$  mit 1 Äquivalent des Disäurechlorids versetzt. Anschließend wird 6h zum Rückfluß erhitzt und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird eingedampft und der verbleibende Rückstand mit Essigester und 1N HCl-Lösung, ges.  $\text{NaHCO}_3$ , ges. NaCl und dest. Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und eingedampft. Die weitere Reinigung wird bei den entsprechenden Verbindungen beschrieben.

#### 4.3.22 Allgemeine Darstellung zur Abspaltung der *t*-Butyloxycarbonyl-Gruppe.

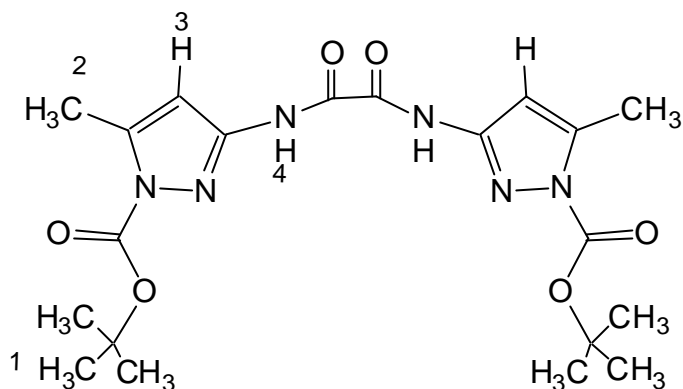
0.5 g der *t*-Butyloxycarbonyl-geschützten Verbindung werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (abs.) gelöst und bei  $0^\circ\text{C}$  mit 6ml TFA versetzt. Es wird 1h über das dünnschichtchromatographisch beobachtete Verschwinden des Edukts gerührt. Das Lösungsmittel wird eingedampft und der verbleibende Rückstand mit ges.  $\text{NaHCO}_3$  und siedendem Essigester (10mal je 75ml) ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert.

#### 4.3.23 *N-N'*-Bis(1-*t*-butyloxycarbonyl-5-methyl-pyrazol-3-yl)-oxalsäurediamid **5**

2g **4** (10 mmol) wurden in 40 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (abs.) nach Vorschrift **4.3.21** gekoppelt. Es wird aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  umkristallisiert, der Rückstand wird mit kaltem *n*-Hexan gewaschen ( $R_F = 0.75$  mit  $\text{CHCl}_3$  : Methanol (30:1)).

**Ausbeute:** 1.1g (5.6 mmol, 56 %)

**Schmelzpunkt:** Zers.  $170^\circ\text{C}$



**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C)**

$\delta = 1.71$  (s, 18 H; 1),  $\delta = 2.32$  (s, 6 H; 2),  $\delta = 6.81$  (s, 2 H; 3),  $\delta = 11.75$  (br, 2 H; 4).

**$^{13}\text{C}$  NMR**

Aufgrund der schlechten Löslichkeit und dem starken Quadrupolmoment der Stickstoffkerne konnte kein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum erhalten werden.

**Massenspektrum (FD)**

$m/z = 448$  ( $\text{M}^+$ )

**Elementaranalyse ber. für  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_6\text{N}_6$ :**

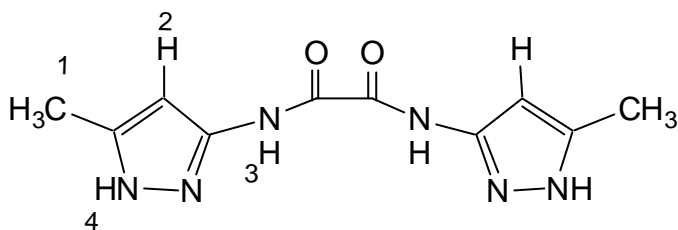
C 53.56, H 6.29, N 18.74; gef.: C 53.30, H 6.22, N 18.79.

**4.3.24 *N,N*-Bis-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-oxalsäurediamid 3**

1g **5** (5.1 mmol) werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (abs.) nach Vorschrift **4.3.22** umgesetzt.

**Ausbeute:** 0.3 g (1.2 mmol, 24 %)

**Schmelzpunkt:** > 230 °C

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25°C)**

$\delta = 2.37$  (s, 6 H; 1),  $\delta = 6.46$  (s, 2 H; 2),  $\delta = 10.70$  (br, 2 H; 3),  $\delta = 12.39$  (br, 2 H; 4).

**<sup>13</sup>C NMR**

Aufgrund der schlechten Löslichkeit und dem starken Quadrupolmoment der Stickstoffkerne konnte kein <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum erhalten werden.

**Massenspektrum (EI)**

$m/z = 248$  (M<sup>+</sup>; 8%), 124 (31%), 97 (Aminomethylpyrazol; 100%)

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (EI)**

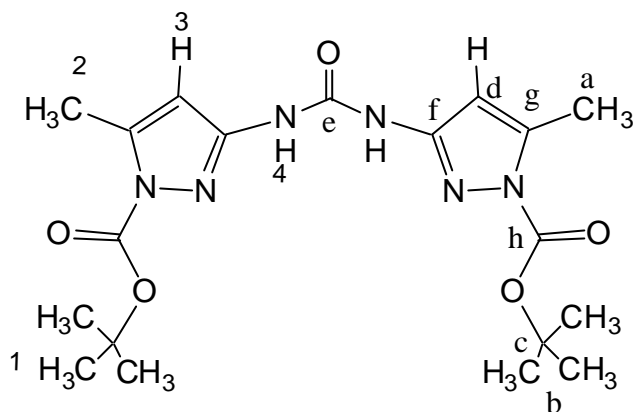
$m/z = 248.1017$  (gem.)      248.1022 (ber.)      0.0005 (Diff.)

**4.3.25 N-N'-Bis-(1-*t*-butyloxycarbonyl-5-methyl-pyrazol-3-yl)-harnstoff 6**

1.22 g **4** (6.2 mmol) wurden in 40 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (abs.) nach Vorschrift **4.3.21** gekoppelt, jedoch wird das Phosgen als eine 1.93 M Lösung in Toluol verwendet. Es wird aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : n-Hexan umkristallisiert (R<sub>F</sub> = 0.66 mit CHCl<sub>3</sub> : Methanol (30:1)).

**Ausbeute:**                      1.1 g (2.6 mmol, 42 %)

**Schmelzpunkt:**              Zers. 161 °C

 **$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ )**

$\delta = 1.69$  (s, 18 H; 1),  $\delta = 2.28$  (s, 6 H; 2),  $\delta = 6.56$  (s, 2 H; 3),  $\delta = 9.73$  (br, 2 H; 4).

 **$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ )**

$\delta = 14.4$  (a),  $\delta = 28.0$  (b),  $\delta = 86.5$  (c),  $\delta = 96.8$  (d),  $\delta = 141.8 + 147.3 + 151.0 + 153.6$  (e, f, g, h).

**Massenspektrum (CI,  $\text{NH}_3$ ,  $200^\circ\text{C}$ )**

$m/z = 421$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ; 40%),  $318$  ( $\text{M}^+-\text{Boc}$  (62%),  $301$  (100%).

**Elementaranalyse ber. für  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{N}_6$ :**

C 54.27, H 6.71, N 19.99; gef.: C 53.67, H 6.87, N 19.66.

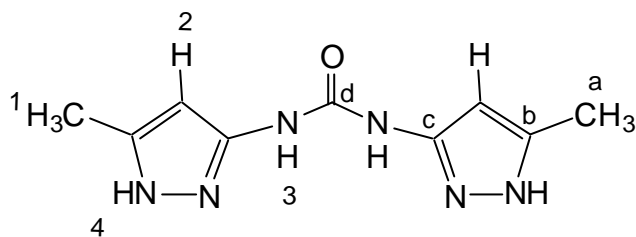
**4.3.26 *N,N'*-Bis-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-harnstoff 7**

0.5 g **6** (1.2 mmol) werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (abs.) nach Vorschrift **4.3.22** umgesetzt.

**Ausbeute:** 0.12 g (0.55 mmol, 45 %)

**Schmelzpunkt:** 202 - 206  $^\circ\text{C}$



 **$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $25^\circ\text{C}$ )**

$\delta = 1.69$  (s, 18 H; 1),  $\delta = 2.28$  (s, 6 H; 2),  $\delta = 6.56$  (s, 2 H; 3),  $\delta = 9.73$  (br, 2 H; 4).

 **$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz, Methanol- $d_4$ ,  $25^\circ\text{C}$ )**

$\delta = 10.9$  (a),  $\delta = 143.8 + 147.2 + 153.4$  (b, c, d).

**Massenspektrum (FAB + NBA)**

$m/z = 221$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ; 62%),  $137$  ( $\text{M}^+$ -Pyrazol (70%),  $51$  (100%).

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (ESI-negativ)**

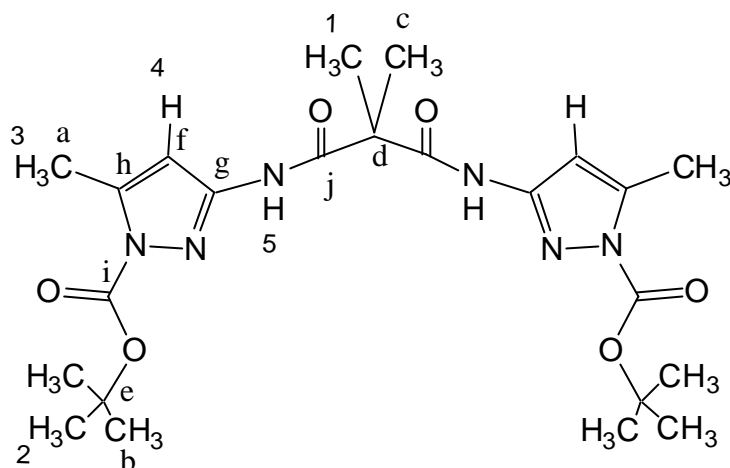
$m/z = 220.1077$  (gem.)       $220.1073$  (ber.)       $0.0004$  (Diff.)

**4.3.27 *N,N'*-Bis-(1-*t*-butyloxycarbonyl-5-methyl-pyrazol-3-yl)-2,2-dimethyl-malonsäurediamid 9.**

1.5 g **4** (7.6 mmol) werden in 30 ml  $\text{CHCl}_3$  (abs) nach Vorschrift **4.3.22** umgesetzt, jedoch wird hier das Chloroform vor der Zugabe des Säurechlorids zum Rückfluß erhitzt. Der Rückstand wird aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : n-Hexan umkristallisiert ( $R_F = 0.44$  mit  $\text{CHCl}_3$  : Methanol (30:1)).

**Ausbeute:**                      1 g (2 mmol, 27 %)

**Schmelzpunkt:**              Zers.  $124^\circ\text{C}$



**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , 25°C)**

$\delta = 1.30$  (s, 6 H; 1),  $\delta = 1.43$  (s, 18 H; 2),  $\delta = 2.03$  (s, 6 H; 3),  $\delta = 6.43$  (s, 2 H; 4),  $\delta = 10.46$  (s, 2 H; 5).

**$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C)**

$\delta = 14.4$  (a),  $\delta = 27.8$  (b),  $\delta = 27.9$  (c),  $\delta = 51.4$  (d),  $\delta = 86.5$  (e),  $\delta = 98.5$  (f),  $\delta = 150.7 + 151.4 + 153.2$  (g, h, i),  $\delta = 169.2$  (j),.

**Massenspektrum (FD)**

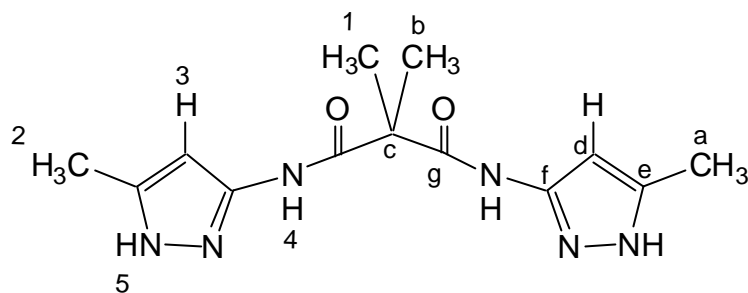
$m/z = 490$  ( $\text{M}^+$ ; 14%),  $390$  ( $\text{M}^+ - \text{Boc}$  (75%),  $290$  ( $\text{M}^+ - 2 \text{ Boc}$  (100%).

**4.3.28 *N,N'*-Bis-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-2,2-dimethyl-malonsäurediamid 8**

0.53 g **9** (1.1 mmol) werden in 30 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (abs) nach Vorschrift **4.3.22** umgesetzt.

**Ausbeute:** 97 mg (0.34 mmol, 31 %)

**Schmelzpunkt:** 204 °C

 **$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C)**

$\delta$  = 1.55 (s, 6 H; 1),  $\delta$  = 2.25 (s, 6 H; 2),  $\delta$  = 6.31 (s, 2 H; 3),  $\delta$  = 9.85 (s, 2 H; 4),  $\delta$  = 12.09 (s, 2 H; 5).

 **$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz, Methanol- $d_4$ , 25°C)**

$\delta$  = 12.2 (a),  $\delta$  = 24.6 (b),  $\delta$  = 52.1 (c),  $\delta$  = 97.2 (d),  $\delta$  = 140.0 + 148.2 + 156.7 (e, f),  $\delta$  = 172.1 (g).

**Massenspektrum (FD)**

$m/z$  = 290 ( $M^+$ ).

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (ESI-negativ ber.  $M+\text{Na}^+$ )**

$m/z$  = 313.1351 (gem.)      313.1389 (ber.)      0.0038 (Diff.)

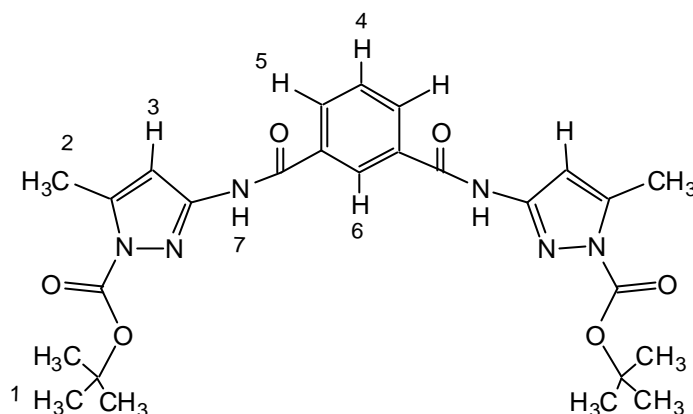
**4.3.29 *N,N'*-Bis-(1-*t*-butyloxycarbonyl-5-methyl-pyrazol-3-yl)-isophthalsäurediamid**

**10**

2 g **20** (10.2 mmol) werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (abs) nach Vorschrift **4.3.22** umgesetzt, jedoch wird mit  $\text{CHCl}_3$  ausgeschüttelt. Der Rückstand wird aus  $\text{CHCl}_3$  : n-Hexan umkristallisiert ( $R_F$  = 0.21 mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : Methanol (20:1)).

**Ausbeute:** 1,2 g (2,3 mmol, 22 %)

**Schmelzpunkt:** 171 °C



### $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C)

$\delta$  = 1.33 (s, 18 H; 1),  $\delta$  = 1.98 (s, 6 H; 2),  $\delta$  = 6.40 (s, 2 H; 3),  $\delta$  = 7.60 (t,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.6$  Hz, 1 H; 4),  $\delta$  = 7.93 (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.3$  Hz, 1 H; 5),  $\delta$  = 8.23 (s, 1 H; 6),  $\delta$  = 10.62 (s, 2 H; 7).

### $^{13}\text{C}$ NMR

Aufgrund der schlechten Löslichkeit und dem starken Quadrupolmoment der Stickstoffkerne konnte kein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum erhalten werden.

### Massenspektrum (FD)

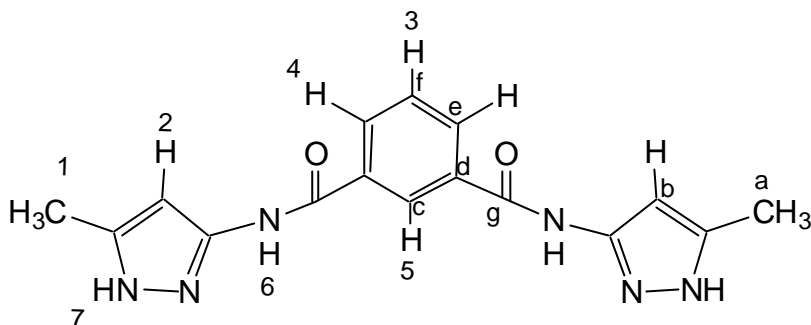
$m/z$  = 524 ( $\text{M}^+$ ; 14%), 424 ( $\text{M}^+$ -Boc (75%), 324 ( $\text{M}^+$ -2 Boc (100%).

### 4.3.30 *N,N'*-Bis-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-isophthalsäurediamid 13

0.5 g **10** (0.95 mmol) werden in 30 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (abs) nach Vorschrift **4.3.22** umgesetzt.

**Ausbeute:** 0.23 g (0.7 mmol, 75 %)

**Schmelzpunkt:** 172 °C


 **$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C)**

$\delta$  = 2.30 (s, 6 H; 1),  $\delta$  = 6.50 (s, 2 H; 2),  $\delta$  = 7.67 (t,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 7.6 Hz, 1 H; 3),  $\delta$  = 8.16 (d  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 8.0 Hz, 1 H; 4),  $\delta$  = 8.61 (s, 2 H; 5),  $\delta$  = 10.74 (s, 2 H; 6),  $\delta$  = 12.21 (s, 2 H; 7).

 **$^{13}\text{C}$  NMR (50.4 MHz, Methanol- $d_4$ , 25°C)**

$\delta$  = 12.2 (a),  $\delta$  = 97.5 (b),  $\delta$  = 128.1 + 130.0 + 132.1 + 135.6 (c, d, e, f),  $\delta$  = 165.1 (g).

**Massenspektrum (EI)**

$m/z$  = 324 ( $M^+$ ; 53 %), 228 ( $M^+$ -Aminopyrazol (100 %), 206 (30%), 97 (Aminopyrazol $^+$  (23 %).

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (ESI-negativ)**

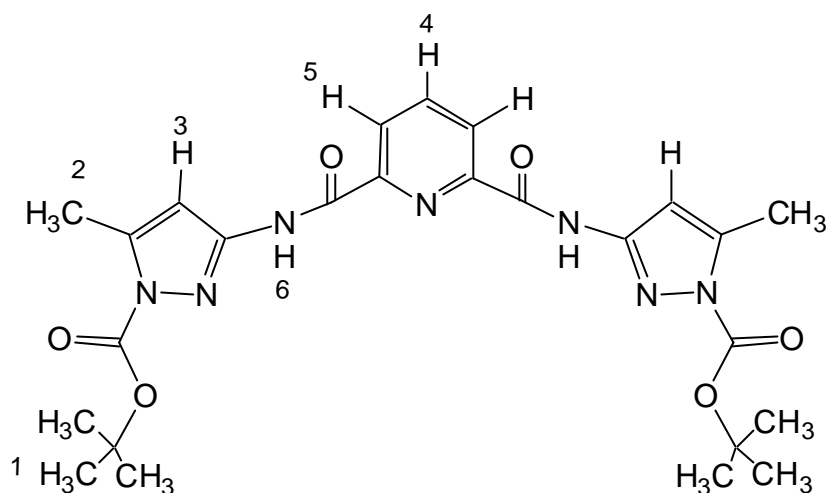
$m/z$  = 324.1328 (gem.)      324.1335 (ber.)      0.0007 (Diff.)

**4.3.31 *N,N'*-Bis-(1-*t*-butyloxycarbonyl-5-methyl-pyrazol-3-yl)-pyridin-2,6-dicarbonsäurediamid 11**

1 g **4** (5.1 mmol) werden in 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (abs) nach Vorschrift **4.3.22** umgesetzt. Der Rückstand wird aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : n-Hexan umkristallisiert ( $R_F$  = 0.36 mit Essigester : n-Hexan (2:1).

**Ausbeute:**                      0.5 g (0.95 mmol, 19 %)

**Schmelzpunkt:**              Zers. 165 °C



### $^1\text{H}$ NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $25^\circ\text{C}$ )

$\delta = 1.57$  (s, 18 H; 1),  $\delta = 2.35$  (s, 6 H; 2),  $\delta = 6.82$  (s, 2 H; 3),  $\delta = 8.16$  (t,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.6$  Hz, 1 H; 4),  $\delta = 8.42$  (d,  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.6$  Hz, 1 H; 5),  $\delta = 12.02$  (s, 2 H; 6).

### $^{13}\text{C}$ NMR

Aufgrund der schlechten Löslichkeit und dem starken Quadrupolmoment der Stickstoffkerne konnte kein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum erhalten werden.

### Massenspektrum (FD)

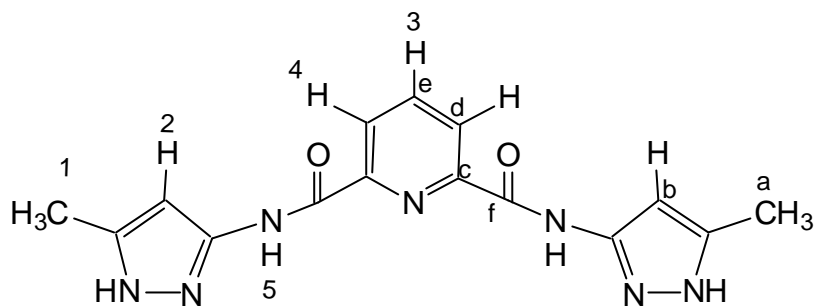
$m/z = 525$  ( $\text{M}^+$ ; 100%), 425 ( $\text{M}^+$ -Boc (12%), 325 ( $\text{M}^+$ -2 Boc (38%).

### 4.3.32 *N,N'*-Bis-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-pyridin-2,6-dicarbonsäurediamid 14

0.4 g **11** (0.76 mmol) werden in 30 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (abs.) nach Vorschrift **4.3.22** umgesetzt.

**Ausbeute:** 0.12 g (0.37 mmol, 49 %)

**Schmelzpunkt:**  $196^\circ\text{C}$

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25°C)**

$\delta$  = 2.20 (s, 6 H; 1),  $\delta$  = 6.43 (s, 2 H; 2),  $\delta$  = 8.16 (t,  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 7.0 Hz, 1 H; 3),  $\delta$  = 8.24 (d  $^3J(\text{H}, \text{H})$  = 6.9 Hz, 1 H; 4),  $\delta$  = 11.62 (s, 2 H; 5).

**<sup>13</sup>C NMR (50.4 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25°C)**

$\delta$  = 12.2 (a),  $\delta$  = 97.9 (b),  $\delta$  = 126.4 + 140.0 + 150.4 (c, d, e),  $\delta$  = 162.8 (f).

**Massenspektrum (CI, NH<sub>3</sub>, 200°C)**

$m/z$  = 326 (M+H<sup>+</sup>; 100%).

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (ESI-negativ)**

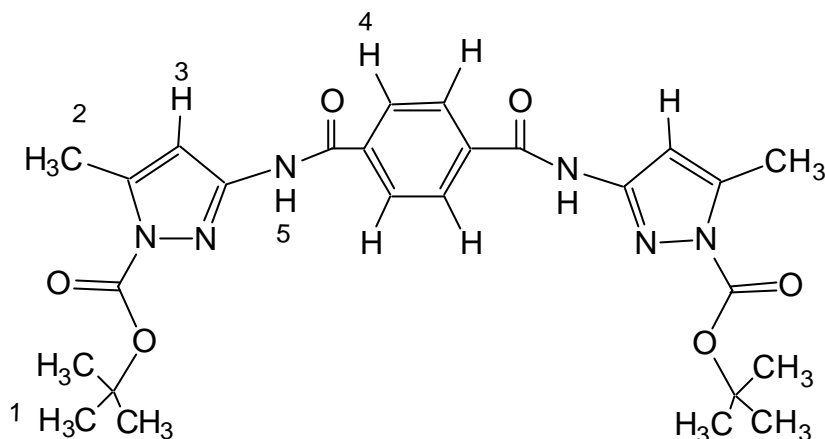
$m/z$  = 325.1271 (gem.)      325.1287 (ber.)      0.0016 (Diff.)

**4.3.33 N,N'-Bis-(1-*t*-butyloxycarbonyl-5-methyl-pyrazol-3-yl)-terephthalsäurediamid 12**

1 g **4** (5.1 mmol) werden in 30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (abs.) nach **4.3.21** umgesetzt. Der Rückstand wird aus CHCl<sub>3</sub> : n-Hexan umkristallisiert ( $R_F$  = 0.79 mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Methanol (20:1)).

**Ausbeute:**                      0.78 g (1.5 mol, 29 %)

**Schmelzpunkt:**              Zers. 181 °C



### $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C)

$\delta = 1.49$  (s, 18 H; 1),  $\delta = 2.19$  (s, 6 H; 2),  $\delta = 6.57$  (s, 2 H; 3),  $\delta = 8.02$  (s, 4H; 4),  $\delta = 10.76$  (s, 2 H; 5).

### $^{13}\text{C}$ NMR

Aufgrund der schlechten Löslichkeit und dem starken Quadrupolmoment der Stickstoffkerne konnte kein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum erhalten werden.

### Massenspektrum (FD)

$m/z = 524$  ( $M^+$ ; 36 %),  $424$  ( $M^+$ -Boc (21 %),  $325$  ( $M^+$ -2 Boc (100 %)).

### Elementaranalyse ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{N}_6$ :

C 59.53, H 6.15, N 16.02; gef.: C 59.20, H 6.55, N 15.89.

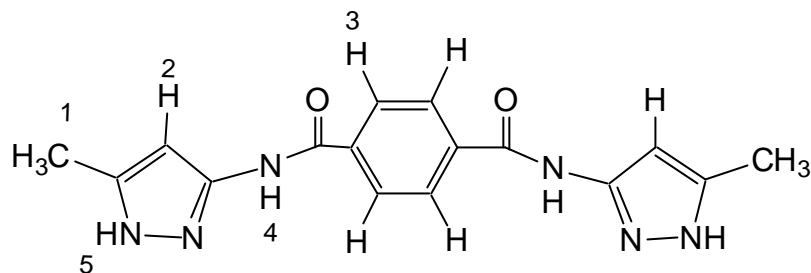
### 4.3.34 *N,N'*-Bis-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-terephthalsäurediamid 15

0.5 g **12** (0.95 mmol) werden in 30 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (abs) nach **4.3.22** umgesetzt.

**Ausbeute:** 0.1 g (0.3 mmol, 33 %)

**Schmelzpunkt:**  $> 230^\circ\text{C}$



 **$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ , 25°C)**

$\delta = 2.35$  (s, 6 H; 1),  $\delta = 6.53$  (s, 2 H; 2),  $\delta = 8.18$  (s, 4 H; 3),  $\delta = 10.94$  (s, 2 H; 5),  $\delta = 12.24$  (s, 2 H; 5).

 **$^{13}\text{C}$  NMR**

Aufgrund der schlechten Löslichkeit und dem starken Quadrupolmoment der Stickstoffkerne konnte kein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum erhalten werden.

**Massenspektrum (EI)**

$m/z = 324$  ( $M^+$ ; 13 %), 228 ( $M^+$ -Aminopyrazol (34 %), 206 (30%), 97 (Aminopyrazol $^+$  (35 %), 44 ( $\text{CO}_2^+$ ).

**Hochaufgelöstes Massenspektrum (EI)**

$m/z = 324.1333$  (gem.)      324.1335 (ber.)      0.0002 (Diff.)

## 5. Anhang

Bei der Bestimmung von Bindungskonstanten mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Titrationen können jeweils die CIS mehrerer Protonensignale verfolgt werden. Dabei ist eine gewisse Streuung der erhaltenen Ergebnisse normal und es muß eine Entscheidung getroffen werden, welcher der Werte zuverlässig ist.

Die verlässlichere Assoziationskonstante ist die mit dem kleinsten Fehler, der von dem verwendeten Auswertprogramm für jedes einzelne verfolgte Signal angegeben wird. In dieser Doktorarbeit mußten, bedingt durch das untersuchte empfindliche System, alle Titrationen unter Schutzgas und mit sehr trockenen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Deshalb können bereits durch geringe Mengen von Verunreinigungen unsystematische Fehler auftreten. Diese wirken sich durch die bei der Auswertung durchgeführte nicht-lineare Regression wesentlich stärker aus als bei linearen Auswertverfahren, deshalb sind Abweichungen von bis zu 40% akzeptabel.

Ein zweites Maßgröße zur Bestimmung der Verlässlichkeit einer Assoziationskonstante ist der vom Programm extrapolierte  $\Delta\delta_{\text{max}}$ -Wert des jeweiligen CIS. Ist dieser groß und der Fehler klein, so ist der zugehörigen Bindungskonstante mehr Bedeutung beizumessen als im umgekehrten Fall. Auch die numerische Differenz der Verschiebungen der ersten und letzten gemessenen Probe ist ein Kriterium für die Auswahl. Denn bei großen CIS ist die Meßungenauigkeit des Spektrometers von geringerem Einfluß und ein systematischer Fehler durch schlechtere Auflösung des Spektrums kleiner.

Kann selbst nach der Untersuchungen dieser Kriterien keine eindeutige Entscheidung für eine Bindungskonstante getroffen werden, so kann der Mittelwert der einzelnen erhaltenen Konstanten als zuverlässige Lösung angesehen werden.

Zur Vereinfachung sind alle ausgewählten, als verlässlich beurteilten, Bindungskonstanten in der Spalte  $\delta^a$  aufgeführt. Wurde ein Durchschnittswert ermittelt so ist dieser unter den beiden Konstanten angegeben.

**Tabelle 5.1:** NMR-Titration zwischen Wirt **20** und Gast **26** in  $CDCl_3$ 

Einwaage: Wir**20**: 4.050 mg ( 7.80  $\mu$  mol) in 7 ml  $CDCl_3$   
 Gast **26**: 6.515 mg ( 30.13  $\mu$  mol) in 2 ml  $CDCl_3$

Probe	V <sub>Wirt</sub> [ ml]	V <sub>Gast</sub> [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	8.2815	7.1309
1	0.7	0.02	8.3038	7.1411
2	0.7	0.04	-	-
3	0.7	0.06	8.3372	7.1524
4	0.7	0.08	8.3562	7.1593
5	0.7	0.1	8.3651	7.1648
6	0.7	0.12	8.3799	7.1674
7	0.7	0.16	8.4074	7.1795
8	0.7	0.24	8.4385	7.1929
9	0.7	0.4	8.4933	7.2201
<sup>a</sup> N-H der Amidbindung im Pyrazol			$K = 70 \text{ M}^1$	$K = 29 \text{ M}^1$
<sup>b</sup> C-H ortho zu beiden Gruppen am Seitenarm			( $\pm 12.8 \%$ )	( $\pm 40.8 \%$ )
			$\Delta\delta_{\max} = 0.78$ ( $\pm 9.7 \%$ )	$\Delta\delta_{\max} = 0.66$ ( $\pm 36.0 \%$ )

**Tabelle 5.2:** NMR-Titration zwischen Wirt **20** und Gast **27** in  $CDCl_3$ 

Einwaage: Wir**20**: 3.875 mg ( 7.46  $\mu$  mol) in 7 ml  $CDCl_3$   
 Gast **27**: 4.355 mg ( 14.90  $\mu$  mol) in 1.5 ml  $CDCl_3$

Probe	V <sub>Wirt</sub> [ ml]	V <sub>Gast</sub> [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	8.2904	6.9616
1	0.7	0.02	8.2928	6.9616
2	0.7	0.04	-	6.9627
3	0.7	0.06	-	6.9638
4	0.7	0.08	8.3014	6.9638
5	0.7	0.1	8.3036	6.9648
6	0.7	0.12	8.3058	6.9660
7	0.7	0.16	8.3114	6.9671
8	0.7	0.24	8.3202	6.9688
9	0.7	0.4	8.3270	6.9704
<sup>a</sup> N-H der Amidbindung im Pyrazol			$K = 45 \text{ M}^1$	$K = 50 \text{ M}^1$
<sup>b</sup> C-H para zur Amidbindung am Seitenarm			( $\pm 81.8 \%$ )	( $\pm 114.4 \%$ )
			$\Delta\delta_{\max} = 0.28$ ( $\pm 70.3 \%$ )	$\Delta\delta_{\max} = 0.28$ ( $\pm 71.5 \%$ )

**Tabelle 5.3:** NMR-Titration zwischen Wirt **20** und Gast **32** in  $CDCl_3$ 

Einwaage: Wir**20**: 4.215 mg ( 8.11  $\mu$  mol) in 7 ml  $CDCl_3$   
 Gast **32**: 7.765 mg ( 24.32  $\mu$  mol) in 1.5 ml  $CDCl_3$

Probe	V <sub>Wirt</sub> [ ml]	V <sub>Gast</sub> [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	6.4717	6.9000
1	0.7	0.04	6.4452	6.8950
2	0.7	0.06	6.4374	6.8911
3	0.7	0.08	6.4324	6.8889
4	0.7	0.1	6.4269	6.8878
5	0.7	0.12	6.4225	6.8856
6	0.7	0.14	6.4203	6.8839
7	0.7	0.16	6.4170	6.8823
8	0.7	0.2	6.4081	6.8801
9	0.7	0.4	6.3860	6.8745
<sup>a</sup> aromatisches C-H im Pyrazol			$K = 280 \text{ M}^{-1}$	$K = 191 \text{ M}^{-1}$
<sup>b</sup> C-H para zur Amidgruppe am Seitenarm			( $\pm 18.8 \%$ )	( $\pm 14.7 \%$ )
			$\Delta\delta_{\max} = 0.14$	$\Delta\delta_{\max} = 0.05$
			( $\pm 9.7 \%$ )	( $\pm 8.7 \%$ )

**Tabelle 5.4:** NMR-Titration zwischen Wirt **21** und Gast **27** in  $CDCl_3$ 

Einwaage: Wir**21**: 3.855 mg ( 7.19  $\mu$  mol) in 7 ml  $CDCl_3$   
 Gast **27**: 5.865 mg ( 20.01  $\mu$  mol) in 1.5 ml  $CDCl_3$

Probe	V <sub>Wirt</sub> [ ml]	V <sub>Gast</sub> [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	7.2857	6.4700
1	0.7	0.04	7.3045	6.4601
2	0.7	0.06	7.3177	6.4535
3	0.7	0.08	7.3200	6.4500
4	0.7	0.1	7.3332	6.4490
5	0.7	0.12	7.3421	6.4479
6	0.7	0.14	7.3454	6.4424
7	0.7	0.16	7.3487	6.4402
8	0.7	0.2	7.3664	6.4391
9	0.7	0.4	7.3697	6.4291
<sup>a</sup> C-H para zur Amidbindung am Seitenarm			$K = 351 \text{ M}^{-1}$	$K = 350 \text{ M}^{-1}$
<sup>b</sup> aromatisches C-H im Pyrazol			( $\pm 36.2 \%$ )	( $\pm 19.0 \%$ )
			$\Delta\delta_{\max} = 0.15$	$\Delta\delta_{\max} = 0.07$
			( $\pm 18.4 \%$ )	( $\pm 10.0 \%$ )

**Tabelle 5.5:** NMR-Titration zwischen Wirt **19** und Gast **26** in  $CDCl_3$ 

Einwaage: Wirt **19**: 3.53 mg ( 6.62  $\mu$  mol) in 7 ml  $CDCl_3$   
 Gast **26**: 3.285 mg ( 15.19  $\mu$  mol) in 1.5 ml  $CDCl_3$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ ml]	$V_{\text{Gast}}$ [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	7.2152	6.5145
1	0.7	0.04	7.2330	6.5090
2	0.7	0.06	7.2396	6.5057
3	0.7	0.08	7.2474	6.5035
4	0.7	0.1	7.2530	6.5014
5	0.7	0.12	7.2627	6.4990
6	0.7	0.14	7.2696	6.4981
7	0.7	0.16	7.2719	6.4949
8	0.7	0.24	7.2942	6.4885
9	0.7	0.4	7.2988	6.4875
<sup>a</sup> C-H para zur Amidbindung am Seitenarm			$K = 83 \text{ M}^1$	$K = 111 \text{ M}^1$
<sup>b</sup> aromatisches C-H im Pyrazol			( $\pm 39.4 \%$ )	( $\pm 35.1 \%$ )
			$\Delta\delta_{\text{max}} = 0.40$	$\Delta\delta_{\text{max}} = 0.12$
			( $\pm 32.0 \%$ )	( $\pm 27.2 \%$ )

**Tabelle 5.6:** NMR-Titration zwischen Wirt **19** und Gast **28** in  $CDCl_3$ 

Einwaage: Wirt **19**: 3.825 mg ( 7.17  $\mu$  mol) in 7 ml  $CDCl_3$   
 Gast **28**: 2.685 mg ( 11.56  $\mu$  mol) in 1.5 ml  $CDCl_3$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ ml]	$V_{\text{Gast}}$ [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	8.5976	7.2271
1	0.7	0.04	8.6407	7.2459
2	0.7	0.06	8.6374	7.2459
3	0.7	0.08	8.6628	7.2526
4	0.7	0.1	8.6751	7.2604
5	0.7	0.12	8.6849	7.2603
6	0.7	0.14	8.6814	7.2625
7	0.7	0.16	-	-
8	0.7	0.28	8.7059	7.2813
9	0.7	0.4	8.7410	7.2885
<sup>a</sup> N-H in Amidbindung im Pyrazol			$K = 899 \text{ M}^1$	$K = 587 \text{ M}^1$
<sup>a</sup> C-H para zur Amidbindung am Seitenarm			( $\pm 44.7 \%$ )	( $\pm 28.4 \%$ )
			$\Delta\delta_{\text{max}} = 0.20$	$\Delta\delta_{\text{max}} = 0.10$
			( $\pm 17.8 \%$ )	( $\pm 13.6 \%$ )

**Tabelle 5.7:** NMR-Titration zwischen Wirt **23** und Gast **32** in  $CDCl_3$ 

Einwaage: Wir**23**: 1.885 mg ( 2.43  $\mu$  mol) in 7 ml  $CDCl_3$   
 Gast **32**: 2.695 mg ( 8.44  $\mu$  mol) in 1.5 ml  $CDCl_3$

Probe	V <sub>Wirt</sub> [ ml]	V <sub>Gast</sub> [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	8.8807	7.1118
1	0.7	0.04	8.7642	-
2	0.7	0.06	8.7272	7.0609
3	0.7	0.08	8.7029	-
4	0.7	0.1	8.6820	7.0392
5	0.7	0.12	8.6666	7.0407
6	0.7	0.14	8.6582	7.0275
7	0.7	0.16	8.6358	7.0125
8	0.7	0.2	8.6234	7.0062
9	0.7	0.4	-	7.0062

<sup>a</sup> N-H in Amidbindung im Pyrazol	$K = 2355 \text{ M}^1$	$K = 1845 \text{ M}^1$
<sup>a</sup> C-H para zur Amidbindung am Seitenarm	( $\pm 9.8 \%$ )	( $\pm 33.5 \%$ )
	$\Delta\delta_{\max} = 0.36$	$\Delta\delta_{\max} = 0.15$
	( $\pm 3.5 \%$ )	( $\pm 11.9 \%$ )

**Tabelle 5.8:** NMR-Titration zwischen Wirt **23** und Gast **33** in  $CDCl_3$ 

Einwaage: Wir**23**: 5.805 mg ( 7.48  $\mu$  mol) in 7 ml  $CDCl_3$   
 Gast **33**: 4.06 mg ( 34.07  $\mu$  mol) in 2.5 ml  $CDCl_3$

Probe	V <sub>Wirt</sub> [ ml]	V <sub>Gast</sub> [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	7.7434	6.1320
1	0.7	0.04	7.7400	6.1240
2	0.7	0.06	7.7194	6.0880
3	0.7	0.08	7.7113	6.0753
4	0.7	0.1	7.7027	6.0520
5	0.7	0.12	7.6913	6.0413
6	0.7	0.14	7.6893	6.0320
7	0.7	0.16	7.6800	6.0266
8	0.7	0.2	7.6713	6.0160
9	0.7	0.4	7.6687	6.0166

<sup>a</sup> C-H ortho zu beiden Gruppen am Seitenarm	$K = 274 \text{ M}^1$	$K = 490 \text{ M}^1$
<sup>b</sup> aromatisches C-H im Pyrazol	( $\pm 65.1 \%$ )	( $\pm 64.1 \%$ )
	$\Delta\delta_{\max} = 0.15$	$\Delta\delta_{\max} = 0.19$
	( $\pm 35.9 \%$ )	( $\pm 28.3 \%$ )
$\emptyset$ : 382 M		

**Tabelle 5.9:** NMR-Titration zwischen Wirt **23** und Gast **34** in  $\text{CDCl}_3$ 

Einwaage: Wir**23**: 5.305 mg ( 6.83  $\mu$  mol) in 7 ml  $\text{CDCl}_3$   
 Gast **34**: 8.525 mg ( 19.76  $\mu$  mol) in 1.5 ml  $\text{CDCl}_3$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ ml]	$V_{\text{Gast}}$ [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	7.9900	7.9281
1	0.7	0.04	7.9872	7.9297
2	0.7	0.06	7.9662	7.9088
3	0.7	0.08	7.9518	7.8944
4	0.7	0.1	7.9419	7.8839
5	0.7	0.12	7.9308	7.8736
6	0.7	0.14	-	-
7	0.7	0.16	7.9176	7.8593
8	0.7	0.2	7.9109	7.8597
9	0.7	0.4	7.8899	7.8318

<sup>a</sup> C-H ortho zu beiden Gruppen am Seitenarm  $K = 134 \text{ M}^1$   $K = 94 \text{ M}^1$   
<sup>b</sup> C-H para zum Carboxylat am Seitenarm  $(\pm 72.1 \%)$   $(\pm 90 \%)$

$\Delta\delta_{\text{max}} = 0.28$   $\Delta\delta_{\text{max}} = 0.33$   
 $(\pm 53.7 \%)$   $(\pm 67.4 \%)$

**Tabelle 5.10:** NMR-Titration zwischen Wirt **2** und Gast **27** in  $\text{CDCl}_3$ 

Einwaage: Wir**2**: 2.375 mg ( 12.29  $\mu$  mol) in 7 ml  $\text{CDCl}_3$   
 Gast **27**: 4.87 mg ( 16.66  $\mu$  mol) in 1.5 ml  $\text{CDCl}_3$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ ml]	$V_{\text{Gast}}$ [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]
0	0.7	0	9.2189
1	0.7	0.04	9.3127
2	0.7	0.06	9.3448
3	0.7	0.08	9.3781
4	0.7	0.1	9.4112
5	0.7	0.12	9.4431
6	0.7	0.14	9.4818
7	0.7	0.16	9.5017
8	0.7	0.2	9.5569
9	0.7	0.4	9.7470

<sup>a</sup> N-H im Pyrazolring  $K = 40 \text{ M}^1$   $(\pm 17.6 \%)$

$\Delta\delta_{\text{max}} = 4.17$   $(\pm 17.1 \%)$

**Tabelle 5.11:** NMR-Titration zwischen Wirt **2** und Gast **26** in  $\text{CDCl}_3$ 

Einwaage:      Wir**2**:    2.69 mg ( 13.92  $\mu\text{mol}$ ) in 7 ml  $\text{CDCl}_3$   
                   Gast **26**:    4.215 mg ( 19.49  $\mu\text{mol}$ ) in 1.5 ml  $\text{CDCl}_3$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ ml]	$V_{\text{Gast}}$ [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	9.1979	6.5327
1	0.7	0.04	9.3328	6.5305
2	0.7	0.06	9.3849	6.5294
3	0.7	0.08	9.4259	6.5283
4	0.7	0.1	9.4735	6.5272
5	0.7	0.12	9.5211	6.5272
6	0.7	0.14	9.5499	6.5270
7	0.7	0.16	9.5819	6.5270
8	0.7	0.2	9.6915	6.5250
9	0.7	0.4	9.9238	6.5217
<sup>a</sup> N-H in der Mitte des Dipeptids			$K = 51 \text{ M}^1$	$K = 187 \text{ M}^1$
<sup>b</sup> N-H im Pyrazolring			( $\pm 29 \%$ )	( $\pm 49.1 \%$ )
			$\Delta\delta_{\text{max}} = 3.95$	$\Delta\delta_{\text{max}} = 0.06$
			( $\pm 30.9 \%$ )	( $\pm 23.1 \%$ )

**Tabelle 5.12:** Job-Plot-Experiment zwischen Wirt **20** und Gast **26** in  $\text{CDCl}_3$ 

Einwaage:      Wir**20**: 3.165 mg ( 6.1  $\mu\text{mol}$ ) in 3.6 mL  $\text{CDCl}_3$   
                   Gast **26**: 1.61 mg ( 7.45  $\mu\text{mol}$ ) in 4.2 mL  $\text{CDCl}_3$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ $\mu\text{l}$ ]	$V_{\text{Gast}}$ [ $\mu\text{l}$ ]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	500	0	6.3639	4.4088
1	720	80	6.3639	4.4077
2	640	160	6.3650	4.4077
3	560	240	6.3628	4.4066
4	320	320	6.3661	4.4055
5	480	400	6.3695	4.4058
6	460	480	6.3684	4.4055
7	240	560	6.3684	4.4044
8	160	640	6.3650	4.4044
9	80	520	6.3650	4.4037
<sup>a</sup> N-H in der Mitte des Dipeptids			$x = 0.50$	$x = 0.55$
<sup>b</sup> $\alpha$ -CH zum Methylester				



**Tabelle 5.13:** Job-Plot-Experiment zwischen Wirt **28** und Gast **20** in  $\text{CDCl}_3$ 

Einwaage: Wir**28**: 2.85 mg ( 12.27  $\mu$  mol) in 3.6 mL  $\text{CDCl}_3$   
 Gast **20**: 6.28 mg ( 12.1  $\mu$  mol) in 3.6 mL  $\text{CDCl}_3$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ $\mu$ l ]	$V_{\text{Gast}}$ [ $\mu$ l ]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0	400	8.5048	6.4104
1	720	80	8.4948	6.4280
2	640	160	8.4838	-
3	560	240	8.4749	6.4336
4	480	320	8.4617	6.4313
5	400	400	8.4397	6.4313
6	320	480	8.4243	6.4302
7	240	560	8.3713	6.4369
8	160	640	8.3423	6.4301

<sup>a</sup> N-H der Amidbindung im Pyrazol

<sup>b</sup> N-H an der Acetylgruppe

$x = 0.66$

$x = 0.33$

**Tabelle 5.14:** Job-Plot-Experiment zwischen Wirt **27** und Gast **21** in  $\text{CDCl}_3$ 

Einwaage: Wir**27**: 1.525 mg ( 5.22  $\mu$  mol) in 4.2 mL  $\text{CDCl}_3$   
 Gast **21**: 3.19 mg ( 5.95  $\mu$  mol) in 3.6 mL  $\text{CDCl}_3$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ $\mu$ l ]	$V_{\text{Gast}}$ [ $\mu$ l ]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	500	0	6.0644	5.9826
1	720	80	6.0699	5.9859
2	640	160	6.0744	5.9882
3	560	240	6.0799	5.9892
4	320	320	6.0898	5.9926
5	480	400	6.0876	5.9904
6	460	480	6.0887	5.9915
7	240	560	6.0976	5.9948
8	160	640	6.1009	5.9959
9	80	520	6.1053	5.9981

<sup>a</sup> N-H in der Mitte des Dipeptids

<sup>b</sup> N-H an der Acetylgruppe

$x = 0.49$

$x = 0.56$

**Tabelle 5.15:** Job-Plot-Experiment zwischen Wirt **28** und Gast **19** in  $\text{CDCl}_3$ 

Einwaage: Wir**28**: 1.525 mg ( 5.22  $\mu$  mol) in 3.6 mL  $\text{CDCl}_3$   
 Gast **19**: 3.19 mg ( 5.95  $\mu$  mol) in 4.0 mL  $\text{CDCl}_3$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ $\mu$ l ]	$V_{\text{Gast}}$ [ $\mu$ l ]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0	400	8.6297	7.7720
1	160	640	8.6388	7.7701
2	240	560	8.6473	7.7808
3	320	480	8.6529	7.7842
4	400	400	8.6697	7.7844
5	480	320	8.6706	7.7830
6	560	240	8.6728	7.7764
7	640	160	8.6827	7.7731

<sup>a</sup> N-H der Amidbindung im Pyrazol

<sup>b</sup> C-H ortho zu beiden Gruppen am Seitenarm

x = 0.50

x = 0.56

**Tabelle 5.16:** Job-Plot-Experiment zwischen Wirt **32** und Gast **23** in  $\text{CDCl}_3$ 

Einwaage: Wir**32**: 2.54 mg ( 7.95  $\mu$  mol) in 4.2 mL  $\text{CDCl}_3$   
 Gast **23**: 3.24 mg ( 4.17  $\mu$  mol) in 3.6 mL  $\text{CDCl}_3$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ $\mu$ l ]	$V_{\text{Gast}}$ [ $\mu$ l ]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	500	0	5.7483 <sup>c</sup>	7.9666
1	720	80	5.8179	7.8972
2	640	160	5.8582	7.8052
3	560	240	5.9075	7.7369
4	480	320	5.9710	7.6842
5	400	400	6.0456	7.6471
6	320	480	6.1141	7.6383
7	240	560	6.1893	7.6781
8	160	640	6.2744	7.5901
9	80	720	6.3076	7.4504

<sup>a</sup> aromatisches C-H im Pyrazol

<sup>b</sup> N-H in der Mitte des Dipeptids

x = 0.51

x = 0.67

<sup>c</sup> Wert wurde separat bestimmt

**Tabelle 5.17:** NMR-Titration zwischen Wirt **16** und Gast **3** in  $CDCl_3$  (6% DMSO- $d_6$ )

Einwaage: Wirt **16**: 2.81 mg ( 7.84  $\mu$  mol) in 7 ml  $CDCl_3$   
 Gast **3**: 4.765 mg ( 19.2  $\mu$  mol) in 1.5 ml  $CDCl_3$

Probe	V <sub>Wirt</sub> [ ml]	V <sub>Gast</sub> [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	7.0160	7.2559
1	0.7	0.04	7.0790	7.2713
2	0.7	0.06	7.1055	-
3	0.7	0.08	7.1243	7.3432
4	0.7	0.1	-	-
5	0.7	0.12	7.1575	7.3752
6	0.7	0.14	7.1586	7.3763
7	0.7	0.16	7.1928	7.4106
8	0.7	0.2	7.1961	7.4161
9	0.7	0.4	7.2304	7.4393
<sup>a</sup> neben der Acetylgruppe			$K = 572 \text{ M}^{-1}$	$K = 335 \text{ M}^{-1}$
<sup>b</sup> in der Amidregion			( $\pm 13.3 \%$ )	( $\pm 61.5 \%$ )
			$\Delta\delta_{\max} = 0.31$	$\Delta\delta_{\max} = 0.33$
			( $\pm 5.5 \%$ )	( $\pm 31.1 \%$ )

**Tabelle 5.18:** NMR-Titration zwischen Wirt **16** und Gast **7** in  $CDCl_3$  (6% DMSO- $d_6$ )

Einwaage: Wirt **16**: 1.415 mg ( 3.95  $\mu$  mol) in 7 ml  $CDCl_3$   
 Gast **7**: 2.035 mg ( 9.24  $\mu$  mol) in 1.59 ml  $CDCl_3$

Probe	V <sub>Wirt</sub> [ ml]	V <sub>Gast</sub> [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	7.1513	6.9180
1	0.7	0.04	7.1629	6.9248
2	0.7	0.06	7.1668	-
3	0.7	0.08	7.1735	6.9267
4	0.7	0.1	7.1774	6.9296
5	0.7	0.12	7.1851	6.9316
6	0.7	0.14	7.1900	6.9345
7	0.7	0.16	7.1929	6.9364
8	0.7	0.2	7.2064	6.9422
9	0.7	0.4	7.2248	6.9509
<sup>a</sup> in der Amidregion			$K = 84 \text{ M}^{-1}$	$K = 58 \text{ M}^{-1}$
<sup>b</sup> neben der Acetylgruppe			( $\pm 41.0 \%$ )	( $\pm 71.3 \%$ )
			$\Delta\delta_{\max} = 0.53$	$\Delta\delta_{\max} = 0.31$
			( $\pm 35.7 \%$ )	( $\pm 64.4 \%$ )

**Tabelle 5.19:** NMR-Titration zwischen Wirt **16** und Gast **8** in  $\text{CDCl}_3$  (6%  $\text{DMSO-}d_6$ )

Einwaage: Wirt **16**: 3.285 mg ( 9.166  $\mu\text{mol}$ ) in 7 ml  $\text{CDCl}_3$   
 Gast **8**: 6.290 mg ( 21.67  $\mu\text{mol}$ ) in 1.59 ml  $\text{CDCl}_3$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ ml]	$V_{\text{Gast}}$ [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	7.0304	7.1685
1	0.7	0.04	7.0657	7.1796
2	0.7	0.06	7.0768	7.1829
3	0.7	0.08	7.0868	7.1840
4	0.7	0.1	7.0978	7.1859
5	0.7	0.12	-	7.1884
6	0.7	0.14	7.1100	7.1906
7	0.7	0.16	-	7.1906
8	0.7	0.2	7.1342	7.1972
9	0.7	0.4	7.1641	7.2039
<sup>a</sup> neben der Acetylgruppe			$K = 216 \text{ M}^{-1}$	$K = 321 \text{ M}^{-1}$
<sup>b</sup> in der Amidregion			( $\pm 11.9 \%$ )	( $\pm 22.6 \%$ )
			$\Delta\delta_{\text{max}} = 0.26$	$\Delta\delta_{\text{max}} = 0.06$
			( $\pm 6.7 \%$ )	( $\pm 11.3 \%$ )

**Tabelle 5.20:** NMR-Titration zwischen Wirt **16** und Gast **13** in  $\text{CDCl}_3$  (6%  $\text{DMSO-}d_6$ )

Einwaage: Wirt **16**: 2.305 mg ( 6.43  $\mu\text{mol}$ ) in 7 ml  $\text{CDCl}_3$  mit 6%  $\text{DMSO-}d_6$   
 Gast **13**: 3.47 mg ( 10.7  $\mu\text{mol}$ ) in 1.5 ml  $\text{CDCl}_3$  mit 6%  $\text{DMSO-}d_6$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ ml]	$V_{\text{Gast}}$ [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]
0	0.7	0	7.1984
1	0.7	0.04	7.2094
2	0.7	0.06	7.2183
3	0.7	0.08	7.2205
4	0.7	0.1	7.2249
5	0.7	0.12	7.2304
6	0.7	0.14	7.2326
7	0.7	0.16	7.2356
8	0.7	0.2	7.2470
9	0.7	0.4	7.2647
<sup>a</sup> in der Amidregion			$K = 170 \text{ M}^{-1}$
			( $\pm 30.4 \%$ )
			$\Delta\delta_{\text{max}} = 0.23$
			( $\pm 22.5 \%$ )

**Tabelle 5.21:** NMR-Titration zwischen Wirt **16** und Gast **14** in  $\text{CDCl}_3$  (6%  $\text{DMSO-d}_6$ )

Einwaage: Wirt **16**: 2.3055 mg ( 6.43  $\mu\text{mol}$ ) in 7 ml  $\text{CDCl}_3$  mit 6%  $\text{DMSO-d}_6$   
 Gast **14**: 3.47 mg ( 10.7  $\mu\text{mol}$ ) in 1.5 ml  $\text{CDCl}_3$  mit 6%  $\text{DMSO-d}_6$

Probe	$V_{\text{Wirt}}$ [ ml]	$V_{\text{Gast}}$ [ ml]	$\delta^a$ [ ppm]	$\delta^b$ [ ppm]
0	0.7	0	7.0227	7.1663
1	0.7	0.04	7.0690	7.1762
2	0.7	0.06	7.0790	7.1762
3	0.7	0.08	7.0901	7.1807
4	0.7	0.1	7.0978	7.1851
5	0.7	0.12	7.1044	7.1884
6	0.7	0.14	7.1066	7.1895
7	0.7	0.16	7.1121	7.1884
8	0.7	0.2	7.1155	7.1917
9	0.7	0.4	7.1409	7.1984
<sup>a</sup> neben der Acetylgruppe			$K = 967 \text{ M}^{-1}$	$K = 427 \text{ M}^{-1}$
<sup>b</sup> in der Amidregion			( $\pm 17.9 \%$ )	( $\pm 27.6 \%$ )
			$\Delta\delta_{\text{max}} = 0.14$	$\Delta\delta_{\text{max}} = 0.05$
			( $\pm 5.8 \%$ )	( $\pm 12.7 \%$ )

**Tabelle 5.22:** Job-Plot-Experiment zwischen Wirt **14** und Gast **16** in  $\text{CDCl}_3$  (6%  $\text{DMSO-d}_6$ )

Einwaage: Wirt **14**: 2.53 mg ( 8.18  $\mu\text{mol}$ ) in 4.2 mL  $\text{CDCl}_3$  mit 6%  $\text{DMSO-d}_6$   
 Gast **16**: 2.93 mg ( 7.77  $\mu\text{mol}$ ) in 4.2 mL  $\text{CDCl}_3$  mit 6%  $\text{DMSO-d}_6$

Probe	V <sub>Wirt</sub> [ μ l]	V <sub>Gäst</sub> [ μ l]	δ <sup>a</sup> [ ppm]	δ <sup>b</sup> [ ppm]
0	500	0	8.3843	6.5242
1	720	80	8.3865	6.5231
2	640	160	8.3865	6.5208
3	560	240	8.3887	6.5208
4	320	320	8.3909	6.5186
5	400	400	8.3909	6.5186
6	460	480	8.3898	6.5186
7	240	560	8.3942	6.5153
8	160	640	8.3942	6.5164
9	80	720	8.3942	6.5142
<sup>a</sup> aromatisches C-H in 3-Stellung vom Pyridin			x = 0.53	x = 0.51
<sup>b</sup> aromatisches C-H im Pyrazol				

**Tabelle 5.23:** Job-Plot-Experiment zwischen Wirt **16** und Gast **14** in  $\text{CDCl}_3$  (6%  $\text{DMSO}-d_6$ )

Einwaage: Wir**16**: 2.93 mg ( 7.77  $\mu\text{mol}$ ) in 4.2 mL  $\text{CDCl}_3$  mit 6%  $\text{DMSO}-d_6$   
 Gast **14**: 2.53 mg ( 8.18  $\mu\text{mol}$ ) in 4.2 mL  $\text{CDCl}_3$  mit 6%  $\text{DMSO}-d_6$

Probe	$V_{\text{Wirt}} [\mu\text{l}]$	$V_{\text{Gast}} [\mu\text{l}]$	$\delta^a [\text{ppm}]$
0	500	0	6.9751
1	720	80	6.9861
2	640	160	6.9972
3	560	240	6.9508
4	320	320	7.0248
5	400	400	7.0226
6	460	480	7.0226
7	240	560	7.0326
8	160	640	7.0359
9	80	720	7.0447

<sup>a</sup> neben der Acetylgruppe

$$x = 0.53$$

**Tabelle 5.24:** Job-Plot-Experiment zwischen Wirt **3** und Gast **16** in  $\text{CDCl}_3$  (6%  $\text{DMSO}-d_6$ )

Einwaage: Wir**3**: 2.54 mg ( 7.95  $\mu\text{mol}$ ) in 4.2 mL  $\text{CDCl}_3$  mit 6%  $\text{DMSO}-d_6$   
 Gast **16**: 3.24 mg ( 4.17  $\mu\text{mol}$ ) in 4.2 mL  $\text{CDCl}_3$  mit 6%  $\text{DMSO}-d_6$

Probe	$V_{\text{Wirt}} [\mu\text{l}]$	$V_{\text{Gast}} [\mu\text{l}]$	$\delta^a [\text{ppm}]$	$\delta^b [\text{ppm}]$
0	500	0	6.3204	6.9964
1	720	80	6.3249	7.0466
2	640	160	6.3149	
3	560	240	6.3305	7.0963
4	320	320	6.2884	7.1571
5	400	400	6.2884	7.1549
6	480	480	6.2873	7.1560
7	240	560	6.2895	7.1571
8	160	640	6.2851	7.1571
9	80	720	6.2784	7.1571

<sup>a</sup> aromatisches C-H im Pyrazol

<sup>b</sup> in der Amidregion

$$x = 0.49$$

$$x = 0.57$$

## 7. Literaturverzeichnis

- [ 1] G. Taubes, *Science* **1996**, 271, 1493.
- [ 2] C. M. Dobson, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 329.
- [ 3] P. T. Lansbury, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 317.
- [ 4] R. Kisilevsky, P. E. Fraser, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1997**, 32, 361.
- [ 5] P. T. Lansbury, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 3342.
- [ 6] S. E. Radford, C. M. Dobson, *Cell* **1999**, 97, 291.
- [ 7] J. W. Kelly, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8, 101.
- [ 8] D. Riessner, *Chemie in unserer Zeit* **1996**, 30, 66-74.
- [ 9] S. B. Prusiner, et al., *Cell* **1990**, 673-686.
- [ 10] S. B. Prusiner et al., *Science* **1982**, 216, 136.
- [ 11] S. B. Prusiner et al., *Cell* **1985**, 40, 735.
- [ 12] S. B. Prusiner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10962.
- [ 13] D. Riesner, K. Kellings, K. Post, H. Wille, H. Serban, M. Baldwin, D. Groth, **1996**, 70, 1714-1722.
- [ 14] K. Post, M. Pitschke, O. Schäfer, H. Wille, T. R. Appel, D. Kirsch, I. Mehlhorn, H. Serban, S. B. Prusiner, D. Riesner, *Biol. Chem.* **1998**, 379, 1307.
- [ 15] M. Pitschke, R. Prior, M. Haupt, D. Riesner, *Nature Medicine*, **1998**, 4, 832-834.
- [ 16] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH Verlag, Weinheim **1992**.
- [ 17] C. Soto, E. M. Sigurdsson, L. Morelli, R.A. Kumar, E. M. Castano, B. F. M. Magione, *Med.* **1998**, 4, 822-826.
- [ 18] C. Soto, *Mol. Med. Today* **1999**, 5, 343-350.
- [ 19] C. Soto, *Mol. Med.* **1999**, 77, 184-189.
- [ 20] C. Soto et al., *The Lancet* **2000**, 355, 192-195.
- [ 21] Buddecke, *Grundriß der Biochemie*, 8. Aufl., de Gruyter, Berlin **1989**, 14-32.
- [ 22] F. A. Quiocho, *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61, 1293-1306.
- [ 23] F. Vögtle, *Supramolekulare Chemie*, 2. Aufl., Teubner, Stuttgart **1992**.
- [ 24] J. -M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim **1995**.
- [ 25] D. J. Cram, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1041.
- [ 26] D. J. Cram, J. M. Cram, *Science* **1974**, 183, 803.
- [ 27] R. B. Silverman, *Medizinische Chemie*, VCH, Weinheim **1995**.
- [ 28] Y. Kato, M. Morgan Conn, J. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3279-3284.
- [ 29] S. M. Ngola, P.C. Kearney, S. Mecozzi, K. R. ussel, D. A. Dougherty, *Chem. Soc.* **1999**, 121, 1192-1201.
- [ 30] A. D. Hamilton, *J. Chem. Educ.* **1990**, 67 (10), 821-828.
- [ 31] A. D. Hamilton, N. Pent, A. Muehldorfe, *Pure & Appl. Chem.* **1988**, 60 (4), 533-538.
- [ 32] F.-G. Klärner, U. Burkert, M. Kamieth, R. Boese, J. Benet-Buchholz, *Eur. J.* **1999**, 5(6), 1700-1707.
- [ 33] J. N. H. Reek, A. H. Priem, H. Engelkamp, A. E. Rowan, J. A. A. W. Elemans, R. J. M. Nolte, *Angew. Chem.* **1997**, 119, 9956-9964.
- [ 34] L. J. D` Souza, U. Maitra, *Arg. Chem.* **1996**, 61, 9494-9502.
- [ 35] A. E. Rowan, J. A. A. W. Elemans, R. J. M. Nolte, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 995-1006.
- [ 36] F.-G. Klärner, J. Panitzky, D. Bläser, R. Boese, *Bescheredron* **2001**, 57, 3673-3687.
- [ 37] F.-G. Klärner, J. Benkhoff, R. Boese, U. Burkert, M. Kamieth, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1195-1198.
- [ 38] M. S. Cubberley, B. L. Iversen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7560-7563.
- [ 39] J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. rev.* **1997**, 97, 1303-1324.
- [ 40] J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 870-874.
- [ 41] S. Tsuzuki, M. Yoshida, T. Uchamaru, M. Kakihira, *J. Phys. Chem. A* **2001**, 105, 769-773.
- [ 42] S. D. Zaric, D. M. Popovic, E.-W. Knapp, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 3935-3942.

- 
- [ 43] L. F. Newcomb, T. S. Haque, S. H. Gellman, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 117, 6509-6519.
- [ 44] W. Blokzijl, J. B. F. N. Engelen, *Angew. Chem.* **1999**, 105, 1610-1648.
- [ 45] A. M. Davies, S. T. Teague, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 778-792.
- [ 46] W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology* **1969**, McGraw-Hill, New York, 393.
- [ 47] L. Stryer, *Biochemie* 4. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **1996**.
- [ 48] H.-J. Schneider, *Angewandte Chemie* **1991**, 103, 1419-1439.
- [ 49] M. Feigl, *Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 181.
- [ 50] G. Wagner, M. Feigl, *Tetrahedron* **1988**, 29, 5077.
- [ 51] V. Brandmeier, W. H. B. Sauer, M. Feigl, *Helv. Chim. Acta* **1994**, 77, 70.
- [ 52] D. S. Kemp, B. R. Bowen, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5077.
- [ 53] D. S. Kemp, B. R. Bowen, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5081.
- [ 54] D. S. Kemp, B. R. Bowen, C. C. Muendler, *J. Chem. Soc.* **1990**, 55, 4650.
- [ 55] H. Diaz, J. R. Espina, J. W. Kelly, *Chem. Soc.* **1992**, 114, 8316.
- [ 56] K. Y. Tsang, H. Diaz, N. Graciani, J. W. Kelly, *Chem. Soc.* **1994**, 116, 3988.
- [ 57] D. W. Choo, J. P. Schneider, N. R. Graciani, J. W. Kelly, *Molecules* **1996**, 29, 355.
- [ 58] K. McWilliams, J. W. Kelly, *Org. Chem.* **1996**, 61, 7408.
- [ 59] P. Chitnumsub, W. R. Fiori, H. A. Lashuel, H. Diaz, J. W. Kelly, *Med. Chem.* **1999**, 7, 39.
- [ 60] J. S. Nowick, N. A. Powell, E. J. Martinez, E. M. Smith, G. Noronha, *Chem.* **1992**, 57, 3768.
- [ 61] J. S. Nowick, D. L. Holmes, G. Mackin, G. Noronha, A. J. Shaka, E. M. Smith, *Chem. Soc.* **1996**, 118, 2764.
- [ 62] J. S. Nowick, S. Mahrus, E. M. Smith, J. W. Ziller, *Chem. Soc.* **1996**, 118, 1066.
- [ 63] J. S. Nowick, S. Inka, *Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10903; e) J. S. Nowick, *Chem Res.* **1999**, 32, 287.
- [ 64] J. S. Nowick, J. M. Cary, J. H. Atwood, *Chem. Soc.* **2001**, 123, 5176-5180.
- [ 65] R. Liu, E. J. Sanderson, W. C. Still, *Org. Chem.* **1990**, 55, 5184-5186.
- [ 66] M. Famulok, K.-S. Jeong, G. Deslongchamps, J. Rebek Jr., *J. Chem.* **1991**, 7, 880-882.
- [ 67] T. Schrader, C. Kirsten, *Chem. Soc., Chem Commun.* **1996**, 2089.
- [ 68] T. H. Schrader, C. N. Kirsten, *Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12061.
- [ 69] W. S. Weiner, A. D. Hamilton, *Org. Med. Chem.* **1998**, 8, 681.
- [ 70] M. Davies, M. Bonnat, F. Guiller, J. D. Kilburn, *Chem.* **1998**, 63, 8696-8703.
- [ 71] T. Fessmann, J. D. Kilburn, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2170-2174.
- [ 72] T. Braxmeier, M. Demarcus, T. Fessmann, S. McAteer, J. D. Kilburn, *Eur. J.* **2001**, 7, 1889-1898.
- [ 73] H. Wennemers, M. Conza, M. Nold, P. Krafczyk, *Eur. J.* **2001**, 7, 3342-3347.
- [ 74] J. Elguero, C. Marzin, A. R. Katritzky, P. Lindh, *Heterocyclic Chem. Suppl.* **1976**, 272-278.
- [ 75] H. Dorr, *Prakt. Chem.* **1973**, 315, 382.
- [ 76] W. L. Jorgensen, J. Pranata, *Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 2008-2010.
- [ 77] J. Pranata, S. G. Wierschke, W. L. Jorgensen, *Chem. Soc.* **1991**, 113, 2810-2819.
- [ 78] K. Knorr, mündliche Mitteilung
- [ 79] R. van Bethem, H. Hiemstra, W. N. Speckamp, *Org. Chem.* **1992**, 57, 6083
- [ 80] M. Bruix, J. de Mendoza, R. M. Claramunt, J. Elguero, *Reson. Chem.* **1985**, 23, 367.
- [ 81] C. S. Wilcox, *Frontiers in Supramolecular Chemistry and Photochemistry*, VCH, Weinheim, **1991**.
- [ 82] H. J. Schneider, R. Kramer, S. Simova, U. Schreiber, *Chem. Soc.* **1988**, 110, 6442.



- 
- [ 83] Zur Berechnung der Assoziationskonstanten wurde das Programm *SigmaPlot 2000* von Jandel Corporation verwendet.
- [ 84] L. Fielding, *Tetrahedron* **2000**, 56, 6151-6170.
- [ 85] P. J. Comp, *Compt. rend.* **1925**, 180, 928
- [ 86] K. A. Connor, *Binding Constants, The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley, New York **1987**, 24-28.
- [ 87] M. T. Blanda, J. H. Horner, M. Newcomb, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4626.
- [ 88] Z. B. Maksimovic, C. Reichardt, A. Spitz, *J. Org. Chem.* **1974**, 270, 100-104
- [ 89] Y. Marcus, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 1015-1021
- [ 90] E. Bosch, M. Rosales, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, 88(24), 3541-3546
- [ 91] C. Reichardt, *Solvents and Solvents Effects* 2. Aufl., VCH, Weinheim **1988**.
- [ 92] R. Taylor, O. Kennard, W. Verschoor, *J. Chem. Soc.* **1984**, 106, 244-248.
- [ 93] L. Prins, D. N. Reinhoudt, P. Timmerman, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2446-2492.
- [ 94] J. F. Poduslo, G. L. Curran, A. Kumar, B. Frangione, *J. Neurobiol.* **1999**, 39, 371-382.
- [ 95] B. Schröder, M. Groschup, G. Hunsmann, W. Bodmer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 251, 423-428.
- [ 96] A. P. Davis, R. Wareham, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1344.
- [ 97] L. F. Abbritti, M. Licchelli, P. Pallavicini, L. Parron, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 838-841.
- [ 98] M. Mazik, W. Sickling, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 664-670.
- [ 99] T. Kawamoto, B. S. Hammes, B. Haggerty, G. P. A. Yap, A. L. Rheingold, A. S. Borovik, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 285.
- [ 100] K. Kavallieratos, C. M. Bertao, R. H. Crabtree, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1675.
- [ 101] O. Safarowsky, M. Nieger, R. Fröhlich, F. Vogtle, *J. Org. Chem.* **2000**, 112, 1699.
- [ 102] D. R. Liu, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 36-56
- [ 103] G. L. Verdine, *Nature* **1996**, 384, 11-13.
- [ 104] M. Torneiro, W. C. Still, *Tetrahedron* **1997**, 53, 8739-8750.
- [ 105] C.-T.-Chen, H. Wagner, W. C. Still, *Science* **1997**, 279, 851-853.
- [ 106] S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 173.
- [ 107] D. Seebach, J. L. Matthews, *Chem. Comm.* **1997**, 2015.
- [ 108] B. L. Iverson, *Nature* **1997**, 385, 113.
- [ 109] A. Seitz, *J. Org. Chem.* **1967**, 2978-2979.
- [ 110] M. Newman, H. Lovine, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 4598-4600.
- [ 111] R. C. Fuson, C. H. McKee, *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 2088-2091.
- [ 112] J. Rebek Jr. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 1082-1090.
- [ 113] J. Rebek Jr. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 1090-1094.
- [ 114] A. Renslo, J. Rebek, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 3419-3421.
- [ 115] J. Rebek Jr., B. Askew, M. Killoran, D. Nemeth, E. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2426-2431.
- [ 117] P. Wash, A. Renslo, J. Rebek, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1261-1262.
- [ 118] S. Shinoda, H. Tsukube, Y. Nishimura, I. Yamazaki, A. Okada, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 3757-3762.
- [ 119] A. Yanagisawa, T. Kikuchi, T. Watanabe, H. Yamamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, 72, 2337-2343.
- [ 120] P. Kocis, O. Issakova, N. F. Sepetov, M. Tchelitchieva, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 37, 6623-6626.
- [ 121] M. Rodriguez-Franco, P. S. Lorenzo, A. Martinez, P. Navarro, *Tetrahedron* **1999**, 55, 2763-2772.
- [ 122] T. Okazaki et al., *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, 46, 69-78.
- [ 123] K. Saigo, R.-J. Lin, M. Kubo, A. Youda, M. Hasegawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 1996.
- [ 124] J. C. Nelson, J. G. Saven, J. S. Moore, P. G. Wolynes, *Science* **1997**, 277, 1793.

- 
- [ 125] R. B. Prince, J. G. Saven, J. S. Moore, P. G. Wolynes *Chem. Soc.* **1999**, 121, 3114.
- [ 126] T. Schrader *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2816.
- [ 127] T. Schrader *Org. Chem.* **1998**, 63, 264.
- [ 128] S. Rensing, A. Springer, T. Grawe, T. Schrader *Org. Chem.* **2001**, 66, 5841-5821.
- [ 129] J. A. Settepani, J. B. Stokke *Org. Chem.* **1968**, 2606.
- [ 130] S. M. McElvain, J. P. Schroeder *Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 40-46.
- [ 131] J. Rebek Jr. et al. *Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2426-2431.
- [ 132] B. Tadayoni, K. Parris, J. Rebek *Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4503-4505.
- [ 133] B. Tadayoni, J. Huff, J. Rebek *Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2247-2253.
- [ 134] T. Yvernault, G. Yvernault, J. C. Bollinger *Acad. Sci. Paris* **1978**, 287, 519-521.
- [ 135] J. Coste, E. Frerot, P. J. Org. *Chem.* **1994**, 59, 2436-2446.
- [ 136] O. Keller *Org. Synth.* **1981**, 60, 2145.
- [ 137] S. Dey, P. Garnier *Org. Chem.* **2000**, 65, 7697-7699.
- [ 138] F. Chen, N. Benoit *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 619-625.
- [ 139] R. A. Boissonna *Helv. Chim. Acta* **1951**, 34, 874.
- [ 140] J. R. Vaughan *Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 3547.
- [ 141] H. Jeschkeit et al. *Prakt. Chem.* **1984**, 326, 638.
- [ 142] T. Miyazawa et al. *Pept. Chem.* **1985**, 22, 265.
- [ 143] A. Sargent et al. *Org. Chem.* **1954**, 19, 599-603.
- [ 144] Cand. Chem. M. Graeser sei für die Darstellung der Chemikalie gedankt.
- [ 145] S. Kubik *Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5846-5855.
- [ 146] Dipl. Chem. J. Bitta sei für die Bereitstellung der Chemikalie gedankt.
- [ 147] A. M. Felix, E. P. Heimer, T. J. Lambros, C. Tzougraki, T. J. Meier *Org. Chem.* **1978**, 43, 4194.
- [ 148] M. K. Anwer, A. F. Spatola *Synthesis* **1980**, 929.
- [ 149] D. Neuhaus, M. Williams *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH, New York **1989**.
- [ 150] C. A. Hunter *Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10292.
- [ 151] M. Hesse, H. Meier, B. Ziegler *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 5. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1995**.
- [ 152] W. König, R. Geiger *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788.
- [ 153] A. P. Bisson, C. A. Hunter *Chem. Comm.* **1996**, 1723-1724.
- [ 154] H. Adams, F. J. Carver, C. A. Hunter *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1628-1631.
- [ 155] F.-G. Klärner, J. Panitzky, D. Preda, L. T. J. Scott *Model.* **2000**, 6, 318.
- [ 156] V. F. Bystryi *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1976**, 10, 41.
- [ 157] M. Delepierre, C. M. Dobson, F. M. Poulton *Biochemistry* **1982**, 21, 4756.
- [ 158] M. Karplus *Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2870.
- [ 159] G. N. Ramachandran, R. Chandrasekaran, K. D. Kopple *Biopolymers* **1974**, 10, 2113.
- [ 160] H. Kessler *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, 21, 512.
- [ 161] H. J. Dyson, P. E. Wright *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **1991**, 20, 519.
- [ 162] K. Wüthrich *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York **1986**.
- [ 163] J. Rao, J. Lahiri, L. Isaacs, R. M. Wies, G. M. Whitesides *Science* **1998**, 280, 708-711.
- [ 164] J. Rao, G. M. Whitesides *Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10286-10290.
- [ 165] M. Feigel *Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 181.
- [ 166] H. Wissmann, H. J. Klein *Angew. Chem. Int. Ed.* **1980**, 19, 133-135.
- [ 167] Der Firma Clariant sei für die Bereitstellung der Chemikalie T 3P gedankt.
- [ 168] H. Paulsen, K. Adermann *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 771-780.
- [ 169] H. Paulsen, K. Adermann *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 751-771.